

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

MELINA LUIZA VIEIRA DINIZ

**DETERMINAÇÃO DE BENZNIDAZOL EM PLASMA HUMANO UTILIZANDO
MICROEXTRAÇÃO POR SORVENTE EMPACOTADO E CROMATOGRÁFIA A
LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA**

BELO HORIZONTE - MG

2021

MELINA LUIZA VIEIRA DINIZ

**DETERMINAÇÃO DE BENZNIDAZOL EM PLASMA HUMANO UTILIZANDO
MICROEXTRAÇÃO POR SORVENTE EMPACOTADO E CROMATOLOGRAFIA A
LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Professor Doutor Christian Fernandes - UFMG

BELO HORIZONTE - MG

2021

Diniz, Melina Luiza Vieira.

D585d Determinação de benznidazol em plasma humano utilizando microextração por sorvente empacotado e cromatografia a líquido de alta eficiência / Melina Luiza Vieira Diniz. – 2021.
138 f. : il.

Orientador: Christian Fernandes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Doença de Chagas – Teses. 2. Benznidazol – Teses. 3. Planejamento experimental – Teses. 4. Preparo de amostras – Teses. 5. Cromatografia líquida de alta eficiência – Teses. 6. Validação de método – Teses. I. Fernandes, Christian. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD:615.4



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

*“DETERMINAÇÃO DE BENZNIDAZOL EM PLASMA HUMANO UTILIZANDO MICROEXTRAÇÃO POR
SORVENTE EMPACOTADO E CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA”*

MELINA LUIZA VIEIRA DINIZ

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Profa. Dra. Adriana Ferreira Faria
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Isabela da Costa César
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Christian Fernandes - Orientador
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 25 de outubro de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Isabela da Costa Cesar, Membro**, em 25/10/2021, às 16:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Christian Fernandes, Professor do Magistério Superior**, em 25/10/2021, às 16:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adriana Ferreira Faria, Professora do Magistério Superior**, em 25/10/2021, às 16:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1031391** e o código CRC **E92C4C71**.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as graças alcançadas, por ser minha força e sustento em todos os dias.

Aos meus pais, Marta e Dinho, por sempre me apoiarem e oferecerem seus conselhos valiosos. Vocês foram fundamentais nesta jornada. Obrigada pelo amor, carinho, força e sabedoria que sempre me deram.

À minha irmã, Ana Cecília, por ser meu ombro amigo de todas as horas. Por ser minha melhor conselheira e companheira. Por ser meu alento quando tudo parecia difícil. Por ser um sorriso ao final do dia. Você me inspira todos os dias! Obrigada!

Ao meu orientador, Christian, por ter sido uma fonte de inspiração para mim. Obrigada pelos seus ensinamentos, pela paciência, pela amizade e por, muitas vezes, andar juntamente comigo para que eu pudesse aprender não somente qual o melhor caminho a ser seguido, mas também como identificar e escolher tal caminho.

Aos colegas do LCQ, André, Luan, Naialy, Mateus Corrêa, Mateus Castro, Rafael Rocha, Jéssica, Douglas, Samir e Talita. Obrigada por compartilhar um pouco do conhecimento de vocês comigo.

Ao Pedro Reis, por desempenhar o papel de mentor até hoje para mim. Obrigada por todo o conhecimento transmitido, todo o aprendizado e experiências compartilhadas, por ser uma fonte de inspiração e um exemplo profissional e pessoal.

Aos professores José Eduardo, Isabela, Pianetti e Cristina, por todo o conhecimento partilhado.

À professora Maria das Graças Carvalho e toda a equipe do Laboratório de Hematologia, em especial à Camila, pela disposição e pela coleta das amostras deste trabalho.

À minha madrinha Cássia, por toda a contribuição para este trabalho e por ser meu anjo de guarda aqui na terra. Espero um dia poder lhe retribuir tudo o que você fez por mim.

Ao meu padrinho Henrique, por ter me mostrado, pela primeira vez, a profissão que hoje exerço com tanto amor. Obrigada por sempre me indicar os melhores caminhos.

Aos meus tios Camila e Rubinho, pois não estaria neste percurso se não fosse por vocês. Vocês sempre me inspiraram, profissionalmente e pessoalmente. E espero, um dia, ser tão boa profissional quanto vocês.

Aos meus tios Juninho, Cláudia, Ivanilde, Delei e Jussara, por todo apoio e confiança que depositam em mim.

Aos meus primos, Sarah, Laura e João, por terem tornado essa caminhada mais leve, com seus sorrisos, suas mensagens e ligações. Vocês me inspiram a fazer do mundo um lugar melhor para se viver.

Às minhas amigas Giovanna, Rafaela e Carol Nogueira, por permitirem compartilhar todos os momentos da minha vida com vocês.

Ao Illuí, por me permitir ter meu *brainstorms* com você e por toda ajuda que me ofereceu durante este tempo.

Ao colegiado de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelo auxílio durante o curso.

À agência de fomento CAPES, pelo apoio com a bolsa de pesquisa.

RESUMO

A doença de Chagas, ainda hoje, afeta de 6 a 7 milhões de pessoas na América Latina e causa cerca de 10 mil mortes por ano, segundo dados da Organização Mundial da Saúde. A doença é causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi*, que é transmitido aos seres humanos através da picada do barbeiro triatomídeo. Na fase crônica da doença pode ocorrer arritmia cardíaca, insuficiência cardíaca, infarto ou mesmo o óbito. O benznidazol é o principal fármaco empregado para o tratamento da doença de Chagas. A determinação da concentração plasmática de benznidazol em humanos é importante em estudos clínicos, farmacocinéticos, no desenvolvimento de novas formulações e na monitorização terapêutica. Nesse contexto, o desenvolvimento de métodos analíticos adequados é fundamental. O uso da microextração por sorvente empacotado (MEPS) na etapa de preparo de amostras visa reduzir o uso de solventes tóxicos e de alto grau de pureza, bem como o volume de amostra. Assim, com este trabalho objetivou-se desenvolver método bioanalítico, empregando-se MEPS no preparo de amostra e cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção UV para determinação de benznidazol em plasma humano. Foi realizada uma etapa prévia por precipitação de proteínas com ácido tricloroacético 10% p/v, a fim de evitar deterioração do cartucho MEPS. A otimização da etapa por MEPS foi realizada por meio de planejamento fatorial 2⁴, obtendo-se uma recuperação de cerca de 25% do analito utilizando-se 500 µL de plasma, 10 ciclos de 100 µL de aspiração e ejeção da amostra, e dessorção com três vezes de 50 µL de acetonitrila. O método bioanalítico foi desenvolvido e validado, apresentando-se seletivo, preciso, exato, robusto e linear na faixa de concentração de 0,5 a 6,0 µg/mL. Por fim, a aplicabilidade do método foi demonstrada na análise de amostra de plasma de três voluntários que fizeram uso de benznidazol. O método bioanalítico desenvolvido e validado poderá ser utilizado em análises farmacocinéticas, na monitorização terapêutica e em estudos de bioequivalência.

Palavras - chave: doença de Chagas; benznidazol; extração em fase sólida; MEPS; planejamento experimental; preparo de amostras miniaturizado.

ABSTRACT

Chagas disease still affects 6 to 7 million people in Latin America and still causes around ten thousand deaths per year, according with the World Health Organization. The disease is caused by the parasite *Trypanosoma cruzi*, which is transmitted to human beings through the bite of the triatomid barber. In the chronic phase of the disease may occur cardiac arrhythmia, heart failure, heart attack or even death. Benznidazole is the main drug used for Chagas disease treatment. The determination of plasmatic concentration in humans is important for pharmacokinetics studies, clinical trials, new drugs development and therapeutic monitoring. In this context, the development of suitable analytical methods is fundamental. The use of microextraction by packed sorbent (MEPS) in sample preparation aim to reduce toxic and high purity solvents use, likewise the sample amount. Thus, with this study, we develop a bioanalytical method using MEPS on sample preparation and high performance liquid chromatography with UV detection. A previous sample preparation step was performed with protein precipitation with 10% w/v trichloroacetic acid, in order to avoid deterioration of the MEPS cartridge. The optimization of the MEPS was performed through a 2⁴ factorial planning, obtaining a recovery of about 25% of the analyte using 500 µL of plasma, 10 cycles of 100 µL sample aspiration and ejection, and desorption with three times of 50 µL of acetonitrile. The bioanalytical method was developed and validated, proving to be selective, precise, accurate, robust and linear in the concentration range 0.5 to 6.0 µg/mL. Finally, the method applicability was showed in the analysis of plasma samples from three volunteers, which made use of benznidazole. The developed bioanalytical method can be used in pharmacokinetic studies, therapeutic drug monitoring and bioequivalence studies.

Keywords: Chagas disease; benznidazole; solid-phase extraction; MEPS; factorial planning; miniaturized sample preparation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estimativa da distribuição dos casos da doença de Chagas no mundo no ano de 2018	19
Figura 2 – Incidência da Doença de Chagas no Brasil, por município, de 2007 a 2019.	21
Figura 3 – Ciclo Evolutivo da doença de Chagas	23
Figura 4 – Estrutura química dos fármacos antichagásicos nifurtimox e benznidazol	24
Figura 5 – Curva DSC do fármaco benznidazol.	26
Figura 6 – Procedimento padrão da técnica de Extração em Fase Sólida (SPE).	38
Figura 7 – Dispositivos utilizados em SPE convencional.	40
Figura 8 – Esquema de síntese dos Polímeros Molecularmente Impressos (MIPs) .	45
Figura 9 – Dispositivos usados na Microextração em Fase Sólida (SPME) e na Extração Sortiva por Barra Magnética (SBSE).....	47
Figura 10 – Cartucho e Seringa MEPS.	49
Figura 11 – Procedimento da Microextração por Sorvente Empacotado.	50
Figura 12 – Estruturas dos sorventes mais comumente utilizados em MEPS.....	51
Figura 13 – Cromatogramas de amostra branco de sangue humano obtidos pelas técnicas de PPT, LLE e MEPS.....	53
Figura 14 – Estrutura Química do Padrão Interno Benzocaína.....	68
Figura 15 – Espectro 2D e 3D na região ultravioleta do benznidazol.....	84
Figura 16 – Gráfico Log D versus pH para Benznidazol.	85
Figura 17 – Distribuição das espécies ionizadas e não-ionizada do Benznidazol.....	86
Figura 18 – Cromatograma obtido após otimização do método cromatográfico.	87
Figura 19 – Gráfico de dispersão concentração de benznidazol versus área sob a curva obtidos na avaliação da linearidade do método analítico.	90

Figura 20 – Gráfico de dispersão dos resíduos obtidos na avaliação da linearidade do método analítico.	91
Figura 21 – Gráfico Q-Q para avaliação da normalidade dos resíduos.....	93
Figura 22 – Gráfico de Durbin-Watson para avaliação da independência dos resíduos.....	94
Figura 23 – Gráfico <i>Normal Plot</i> do Planejamento Fatorial 2^4 para otimização da extração por MEPS.	103
Figura 24 – Gráfico de Pareto do Planejamento Fatorial 2^4 para otimização da extração por MEPS.	103
Figura 25 – Gráfico <i>Normal Plot</i> do Planejamento Fatorial 2^4 para otimização da extração por MEPS.	104
Figura 26 – Gráfico Resíduos vs Valores Preditos do Planejamento Fatorial 2^4 para otimização da extração por MEPS.	105
Figura 27 – Gráfico Resíduos vs Corrida do Planejamento Fatorial 2^4 para otimização da extração por MEPS.	105
Figura 28 – Gráfico Valores Preditos vs Valores Reais do Planejamento Fatorial 2^4 para otimização da extração por MEPS.	106
Figura 29 – Superfícies de resposta do Planejamento Fatorial 2^4 para otimização da extração por MEPS.	108
Figura 30 – Cromatogramas das amostras normais, lipêmica e hemolisada e no LIQ para análise de seletividade do método bioanalítico.	112
Figura 31 – Cromatogramas das amostras fortificadas com cafeína, nicotina e paracetamol para análise de seletividade do método bioanalítico.	114
Figura 32 – Cromatogramas da amostra branco para análise de efeito residual do método bioanalítico.	115
Figura 33 – Curvas de calibração obtidas para avaliação da linearidade do método bioanalítico.	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Solubilidade do benznidazol em diferentes solventes. Entre parênteses encontra-se o desvio padrão.....	27
Tabela 2 – Exemplos de sorventes utilizados em SPE e suas aplicações nos tipos matrizes.....	42
Tabela 3 – Métodos encontrados na literatura para determinação de benznidazol. .	56
Tabela 4 – Diluições realizadas para avaliação da linearidade do método analítico.	65
Tabela 5 – Ensaio de otimização da etapa de precipitação de proteínas.....	70
Tabela 6 – Variáveis e níveis otimizados em planejamento fatorial 2 ⁴	72
Tabela 7 – Matriz experimental com as variáveis codificadas para planejamento fatorial 2 ⁴	73
Tabela 8 – Matriz experimental com as variáveis reais para planejamento fatorial 2 ⁴ para otimização da extração de benznidazol por MEPS.	74
Tabela 9 – Condições para a validação do método bioanalítico para análise de benznidazol em plasma humano.....	76
Tabela 10 – Condições cromatográficas iniciais para desenvolvimento de método analítico.....	83
Tabela 11 – Parâmetros cromatográficos obtidos após a otimização do método analítico.....	89
Tabela 12 – Parâmetros obtidos pela análise de variância (ANOVA) na determinação da linearidade.....	91
Tabela 13 – Teor e desvio padrão relativo das amostras analisadas na precisão. ...	95
Tabela 14 – Respostas de área e tempo de retenção obtidas no ensaio de robustez do método analítico.	97
Tabela 15 – Resultados de recuperação de benznidazol para diferentes sorventes em MEPS.	99
Tabela 16 – Resultados da otimização da etapa de precipitação de proteínas.	100
Tabela 17 – Resultados da otimização da etapa de precipitação com acetonitrila após evaporação e ressuspensão.	101
Tabela 18 – Otimização das condições de extração por meps segundo a função desejabilidade do software Design Expert.....	109

Tabela 19 – Fatores de Matriz Normalizados e desvios padrão relativo para análise de efeito matriz do método bioanalítico.	116
Tabela 20 – Desvios em relação à concentração nominal para avaliação da linearidade do método analítico.	117
Tabela 21 – Desvios Padrão Relativos (DPR) para avaliação da precisão do método analítico.	119
Tabela 22 – Erros Padrão Relativos (EPR) para avaliação da exatidão do método analítico.	120
Tabela 23 –Diferença das razões das áreas do analito e padrão interno nas condições iniciais e finais para análise de estabilidade em matriz biológica.	122
Tabela 24 – Diferença das razões das áreas do analito e padrão interno nas condições iniciais e finais para análise de estabilidade de ciclos de congelamento e descongelamento.	123
Tabela 25 – Concentrações plasmáticas de benznidazol de voluntários sadios que administraram o fármaco.	124

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

λ	Comprimento de onda
°C	Graus Celsius
μg	Microgramas
μm	Micrômetros
μL	Microlitros
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BZC	Benzocaína
BZN	Benznidazol
CLAE	Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência
cm^3	Centímetros cúbicos
CQB	Controle de Qualidade Baixo
CQM	Controle de Qualidade Médio
CQA	Controle de Qualidade Alto
CQD	Controle de Qualidade de Diluição
dL	Decilitros
DPR	Desvio Padrão Relativo
EPR	Erro Padrão Relativo
g	Gramas
HF-LPME	<i>Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction</i> (Microextração em Fase Líquida com Fibra Oca)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência)

IL-DLLME	<i>Ionic Liquid Dispersive Liquid-liquid Microextraction</i> (Microextração Líquido-líquido Dispersiva assistida por Líquidos Iônicos)
Kg	Quilogramas
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco
LIQ	Limite Inferior de Quantificação
LLE	<i>Liquid-liquid Extraction</i> (Extração Líquido-Líquido)
log P	Coeficiente de Partição Octanol-água
LSQ	Limite Superior de Quantificação
MeOH	Metanol
MEPS	<i>Microextraction by Packed Sorbent</i> (Microextração por Sorvente Empacotado)
MIP	<i>Molecularly Imprinted Polymer</i> (Polímero Molecularmente Impresso)
mm	Milímetros
mg	Miligramas
nm	Nanômetros
OMS	Organização Mundial de Saúde
PI	Padrão Interno
PPT	<i>Protein Precipitation</i> (Precipitação de Proteínas)
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
SALLE	<i>Salting-out Assisted Liquid-liquid Extraction</i> (Extração Líquido-Líquido Assistida por <i>Salting-out</i>)
SBSE	<i>Stir Bar Sorptive Extraction</i> (Extração Sortiva por Barra Magnética)
SDME	<i>Single-drop Microextraction</i> (Microextração por Gota Única)
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (Extração em Fase Sólida)

SPME	<i>Solid Phase Microextraction</i> (Microextração em Fase Sólida)
SQR	Substância Química de Referência
TCA	Ácido Tricloroacético
t_r	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Doença de Chagas	19
2.2 Benznidazol	25
2.3 Preparo de Amostras.....	28
2.3.1 <i>Remoção de proteínas</i>	31
2.3.2 <i>Extração líquido-líquido</i>	34
2.3.3 <i>Extração em Fase Sólida convencional</i>	37
2.3.4 <i>Extração em Fase Sólida miniaturizada</i>	46
2.3.5 <i>Microextração por Sorvente Empacotado (MEPS)</i>	48
2.4 Métodos analíticos para a determinação de benznidazol em amostras biológicas	55
3 OBJETIVOS.....	60
3.1 Objetivo geral	60
3.2 Objetivos específicos	60
4 MATERIAIS.....	61
4.1 Insumos Farmacêuticos Ativos (IFAs) e comprimidos de benznidazol	61
4.2 Substâncias Químicas de Referência (SQRs)	61
4.3 Reagentes e Soluções	61
4.3.1 <i>Soluções estoque e de trabalho</i>	62
4.4 Equipamentos e Dispositivos	62
5 MÉTODOS	64
5.1 Desenvolvimento do método analítico por HPLC para análise de benznidazol IFA.....	64
5.1.1 <i>Método cromatográfico</i>	64

5.2 Validação do método analítico por HPLC para análise de benznidazol	64
5.2.1 Linearidade	64
5.2.2 Precisão	65
5.2.3 Exatidão	66
5.2.4 Limites de Detecção e de Quantificação	66
5.2.5 Robustez	66
5.3 Desenvolvimento do método bioanalítico para análise de benznidazol em plasma humano	67
5.3.1 Amostras biológicas	67
5.3.2 Seleção de Padrão Interno	68
5.3.3 Desenvolvimento do método bioanalítico	68
5.3.4 Desenvolvimento de método de extração por MEPS	69
5.4 Validação do método bioanalítico para determinação de benznidazol em plasma humano	75
5.4.1 Seletividade	76
5.4.2 Efeito Residual	78
5.4.3 Efeito Matriz	78
5.4.4 Curva de Calibração	79
5.4.5 Precisão e Exatidão	79
5.4.6 Estabilidade do analito e PI em solução	81
5.4.7 Estabilidade do benznidazol em matriz biológica	81
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
6.1 Desenvolvimento de método analítico por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência	83
6.2 Validação de método analítico por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência para análise de benznidazol	89
6.2.1 Linearidade	90

6.2.2 Precisão	95
6.2.3 Exatidão	96
6.2.4 Limites de Detecção e Quantificação	96
6.2.5 Robustez	96
6.3 Desenvolvimento de método bioanalítico por MEPS-CLAE-UV para a análise de benznidazol em plasma humano	97
6.4 Validação de método bioanalítico por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência para análise de benznidazol em plasma humano	112
6.4.1 Seletividade	112
6.4.2 Efeito Residual	115
6.4.3 Efeito Matriz	116
6.4.4 Curva de Calibração	116
6.4.5 Precisão	119
6.4.6 Exatidão	120
6.4.7 Estabilidade do analito e do padrão interno em solução	121
6.4.8 Estabilidade em matriz biológica	121
6.5 Aplicação de método bioanalítico desenvolvido e validado para análise de benznidazol em plasma humano	123
7 CONCLUSÃO	125
REFERÊNCIAS	126

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, ainda hoje, afeta milhões de pessoas em diversos países, principalmente na América Latina, podendo causar distúrbios cardíacos e neurológicos que diminuem a expectativa de vida das pessoas infectadas. É causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Trypanosoma*, que são transmitidos ao ser humano pela picada de triatomídeos (WHO, 2020).

No Brasil, os casos notificados da doença de Chagas entre 2012 e 2016 foram 19.914, ocorrendo 18 óbitos neste mesmo período. A região mais afetada é a região Norte, principalmente o estado do Pará (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

A farmacoterapia e profilaxia para a doença de Chagas apresentam somente de dois fármacos anti-parasitários: benznidazol e nifurtimox, sendo o primeiro o mais utilizado, inclusive na fase crônica da doença. O benznidazol apresentou melhor prognóstico em paciente em fase crônica da doença (MORENO, 2010), além de menor ocorrência de efeitos adversos (DIAS *et al.*, 2015).

Para garantir o sucesso na farmacoterapia, a monitorização terapêutica se faz necessária, pois subdoses podem causar insucesso do tratamento ou resistência do parasita. Ademais, para uma monitorização correta são necessários métodos bioanalíticos confiáveis, que dependem crucialmente da etapa de preparo de amostra. Tais métodos bioanalíticos também possuem impacto na elucidação farmacocinética do fármaco, no que diz respeito, principalmente, à biodisponibilidade e metabolização.

A técnica de extração em fase sólida é amplamente utilizada, pois permite a extração do analito em matrizes complexas, além de remover potenciais interferentes e pré-concentrar o analito. Entretanto, ainda utiliza grandes volumes de solventes tóxicos ao ambiente e ao ser humano, além de grandes volumes de amostra. Uma miniaturização desta técnica, a Microextração por Sorvente Empacotado (MEPS) foi desenvolvida visando reduzir as quantidades

de solventes utilizados, assim como o volume de amostra, mas obtendo extratos mais limpos, e ainda assim precisos e exatos.

A técnica de MEPS, além de permitir o uso de um menor volume de amostra e menor consumo de solventes, sendo, portanto, mais sustentável, apresenta a possibilidade de injeção direta no sistema cromatográfico (SALAMI; QUEIROZ, 2011). Apesar de ter sido descrita na literatura científica no ano de 2004, ainda não foi descrita nenhuma aplicação desta técnica para extração de benznidazol em plasma humano.

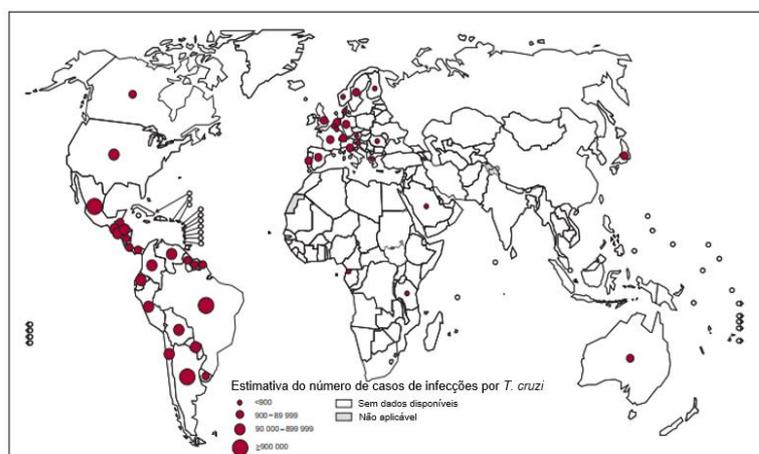
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas, descrita por Carlos Chagas em 1909 (FIOCRUZ, 2013), é uma doença infecciosa causada por protozoários da espécie *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), o que originou a outra denominação da doença, tripanossomíase americana. Americana porque a área endêmica é localizada na América Latina, tendo relação com as condições sanitárias precárias e com a extrema pobreza presentes nesta região. Sua transmissão ocorre através do contato de sangue humano com as fezes e/ou urina de triatomíneos infectados com o protozoário (WHO, 2021). Outros principais vetores são da ordem *Hemiptera e Reduviidae* (DIAS *et al.*, 2015), entretanto em uma escala menor do que os vetores da ordem *Triatominae*.

Estima-se que 6 a 7 milhões de pessoas estão infectadas no mundo, sendo que os países mais afetados estão na América Latina (WHO, 2021). Em 2010 foi descrito um total de 5.742.167 pessoas infectadas por *T. cruzi* nos países latino-americanos (DIAS *et al.*, 2015). Na **Figura 1**, está apresentada a estimativa da Organização Mundial de Saúde dos casos globais da doença de Chagas.

Figura 1 - Estimativa da distribuição dos casos da doença de Chagas no mundo no ano de 2018.



Fonte: Adaptado de World Health Organization (2021).

Devido à grande prevalência da doença de Chagas nos países latino-americanos, De Rycker *et al.* (2018) classificou-a como doenças infecciosas tropicais, juntamente com doenças como malária, dengue, tuberculose, Ebola, dentre outras. Essa classificação remete mais do que somente a uma localização, mas também às condições socioeconômicas e sanitárias destes países, caracterizando a doença de Chagas, assim como as demais doenças tropicais, como doenças negligenciadas. São negligenciadas porque carecem de uma maior participação governamental e privada não somente no tratamento dessas doenças, mas também na prevenção e controle dos agentes infecciosos.

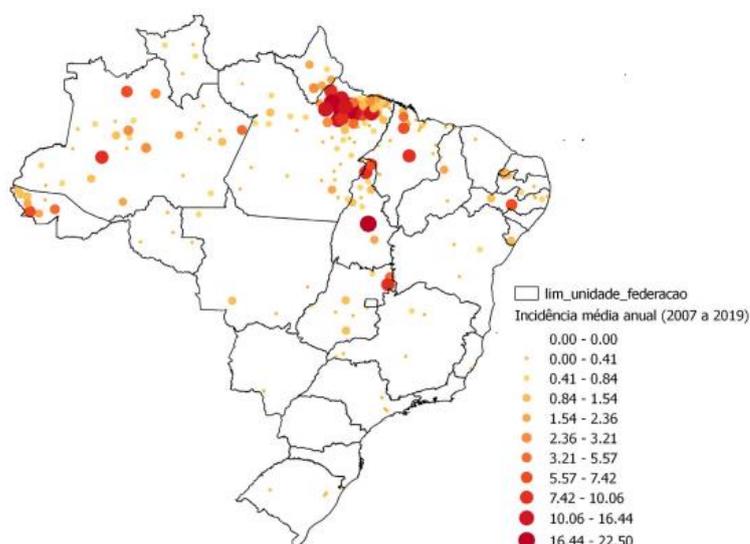
A causa de tão elevado número de casos da doença de Chagas deve-se, além da deficiência sanitária nessas regiões, à migração de pessoas infectadas de forma não controlada, à degradação ambiental que leva à migração dos vetores para áreas urbanas, e às alterações climáticas (DIAS *et al.*, 2015). Esse cenário, aliado a uma baixa condição socioeconômica e educacional provoca um aumento da incidência da tripanossomíase americana, atrasando, por anos, sua erradicação.

Apesar dos esforços iniciados na década de 1970 para a erradicação do vetor *Triatoma infestans*, que rendeu ao Brasil em 2006 o certificado internacional de interrupção de transmissão por este vetor, ainda estima-se que haja, pelo menos, um milhão de pessoas infectadas por *T. cruzi* no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). No período de 2012 a 2016, segundo o mesmo Boletim Epidemiológico, o Ministério da Saúde registrou um total de 1190 novos casos, o que demonstra que a erradicação da doença ainda está longe de acontecer.

A maior ocorrência da doença encontra-se na região Norte, principalmente, no estado do Pará (responsável por cerca de 83% dos casos), onde as condições sociais são mais desfavoráveis, levando à manutenção e criação de reservatórios de triatomídeos, além do aumento de infecção pela ingestão de alimentos contaminados. Em 2020, ocorreram três óbitos em decorrência da doença de Chagas, todos no estado do Pará, além de 146 novos casos em todo o Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). Além disso, mais de

200 óbitos por COVID-19 no Brasil fizeram menção à doença de Chagas como comorbidade e fator de agravamento da doença causada por Sars-CoV-2 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). Na **Figura 2**, está demonstrada a distribuição de casos de doença de Chagas aguda no Brasil, de acordo com município e ano da notificação, de 2007 a 2019.

Figura 2 – Incidência da Doença de Chagas no Brasil, por município, de 2007 a 2019.



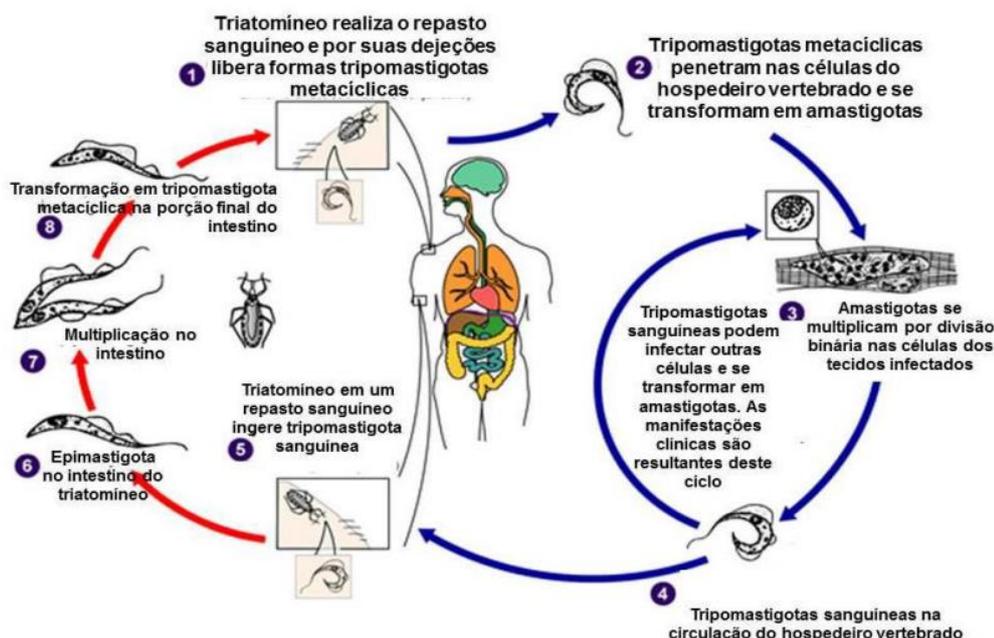
Fonte: Ministério da Saúde (2019).

Os vetores triatomíneos vivem em fendas ou telhados de construções rurais ou suburbanas e possuem hábitos noturnos. Após a picada, o inseto defeca naquela região próxima. A infecção ocorre quando o ser humano coça a região e produz rupturas na pele, levando à introdução das fezes infectadas com *T. cruzi* na corrente sanguínea. A transmissão também pode ocorrer pela ingestão de alimentos contaminados com as fezes deste parasita (WHO, 2021). A doença de Chagas também pode ser transmitida verticalmente (da mãe para o feto), por transfusão de sangue ou doação de órgãos de doadores infectados, ou por acidentes laboratoriais, se o material contaminado entrar em contato com a pele lesionada ou mucosa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

O ciclo evolutivo da doença de Chagas possui duas etapas, uma no hospedeiro invertebrado (o vetor) e outra no hospedeiro vertebrado (mamíferos, mais especificamente, o homem). Durante o ciclo, o parasita pode se apresentar de três formas distintas: amastigotas e epimastigotas (ambas formas replicativas) e tripomastigotas metacíclicas (forma não replicativa, mas infectante). As amastigotas estão presentes no interior das células dos mamíferos, enquanto as epimastigotas são encontradas principalmente no tubo digestivo dos vetores triatomídeos. As formas infectantes, isto é, as tripomastigostas metacíclicas, se encontram nas fezes e urina do vetor transmissor, mas as formas tripomastigotas não-infectantes podem estar presentes no sangue circulante do hospedeiro vertebrado (AZAMBUJA e GARCIA, 2017).

No hospedeiro invertebrado, o *T. cruzi* se diferencia em epimastigotas e, na porção final do intestino, em tripomastigotas metacíclicas. Esse processo de diferenciação denomina-se metaciclogênese. Durante o repasto sanguíneo do vetor, ele deposita a urina ou as fezes repletas de tripomastigotas metacíclicas próximo à picada. Essas formas tripomastigotas metacíclicas entram no hospedeiro vertebrado através da ferida ou de membranas mucosas (por exemplo, a conjuntiva). Após entrar na circulação sanguínea, essas formas invadem as células próximas ao local da ferida, se diferenciando em formas amastigotas intracelulares. Esta última se reproduz por fissão binária, transformando-se em formas tripomastigotas e promovendo a ruptura da célula. Uma vez na corrente sanguínea, as formas tripomastigotas podem migrar para outros tecidos e infectar novas células, produzindo mais formas amastigotas intracelulares e causando a etapa sintomática da infecção. O barbeiro ou invertebrado é infectado ao alimentar-se de sangue humano ou animal que contenha o parasita circulante, reiniciando o ciclo (VIEIRA, 2017). A **Figura 3** contém um esquema sobre o ciclo da doença de Chagas.

Figura 3 – Ciclo Evolutivo da doença de Chagas



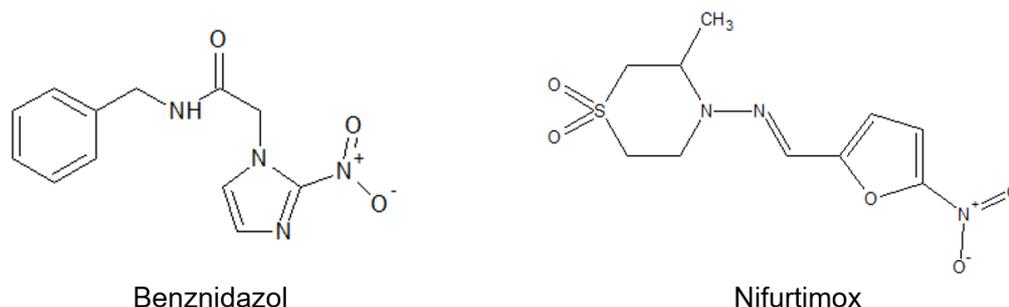
Fonte: Vieira (2017).

Na fase aguda da doença, geralmente há ausência de sintomas ou eles são inespecíficos. Os infectados podem apresentar inicialmente uma lesão epitelial ou um inchaço arroxeado nas pálpebras. Podem apresentar também, febre, dor de cabeça, dor muscular, palidez, inchaço abdominal e das glândulas linfáticas, dor abdominal e torácica e dificuldade em respirar (WHO, 2021). Na fase crônica, aproximadamente 30% dos pacientes sofrem com distúrbios cardíacos e 10% com distúrbios digestivos e/ou neurológicos. A Cardiopatia Chagásica Crônica (CCC) é o quadro clínico mais prevalente da fase sintomática da doença de Chagas, com elevada morbimortalidade (DIAS *et al.*, 2015). A infecção pode evoluir para insuficiência cardíaca progressiva e arritmias cardíacas, ou até mesmo para o óbito (WHO, 2021).

Somente dois fármacos demonstraram-se efetivos no tratamento da doença de Chagas e são usados na prática clínica nos dias atuais: o benznidazol (derivado nitroimidazólico) e o nifurtimox (fármaco nitrofurânico). As poucas opções de tratamento refletem a natureza negligenciada da doença de Chagas, necessitando, como define De Rycker *et al.* (2018), de tratamentos novos, efetivos, seguros e de baixo custo.

As estruturas de ambos os fármacos (benznidazol e nifurtimox) estão representadas na **Figura 4**. Ambos são utilizados na fase aguda da doença e em infecções congênitas, com chance de 100% de cura, se administrados logo após o contato com o parasita. Entretanto, eles não possuem a mesma eficiência na fase crônica. Mesmo assim, em alguns casos, estes fármacos são indicados no início da fase crônica e em pacientes com reinfeção (por exemplo, imunossuprimidos) (WHO, 2021). No Brasil, somente o benznidazol consta na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais de 2020 (BRASIL, 2020).

Figura 4 – Estrutura química dos fármacos antichagásicos nifurtimox e benznidazol



Moreno (2010) relata que alguns estudos indicam que o prognóstico em pacientes chagásicos que administraram benznidazol na fase aguda é ainda melhor do que os que fizeram o tratamento com nifurtimox. Dias *et al.* (2015) defende a inserção do benznidazol na atenção primária à saúde para o tratamento precoce de Chagas, a fim de obter maior chance de cura, uma vez que este fármaco tem demonstrado menor ocorrência de efeitos adversos.

Para maior controle da doença, também é necessário realizar vigilância tanto epidemiológica quanto entomológica. O controle do vetor deve ser feito por meio da sanitização das áreas onde o mesmo possa estar, e também deve-se adotar medidas preventivas individuais, higienizar os alimentos e investigar a qualidade do sangue de doadores (WHO, 2019).

A vigilância epidemiológica deve ser feita de forma a monitorar o número de casos da doença, detectar e tratar precocemente novos casos, monitorar a

morbimortalidade da doença, manter erradicada a transmissão por *T. infestans* (considerada o maior índice de infecção no Brasil) e realizar vigilância sanitária nas áreas de maior índice do parasita (DIAS *et al.*, 2015).

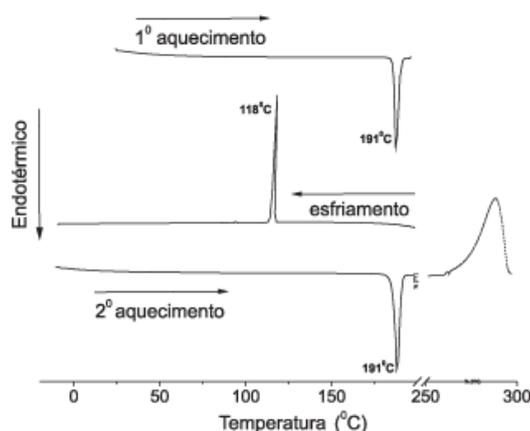
2.2 Benznidazol

O benznidazol é o fármaco de primeira escolha para o tratamento da doença de Chagas. Ele é usado principalmente na fase aguda e em infecções congênitas. Apesar de seu uso na fase crônica ser controverso, ainda é utilizado para impedir reinfecções e a progressão da doença em alguns casos (DAVANÇO, 2015).

A estrutura química do benznidazol está representada na **Figura 4**. Sua massa molar é igual a 260,25 g/mol. Apresenta em sua estrutura um doador e quatro aceptores de ligação de hidrogênio. Seu ponto de fusão está entre 190 e 192 °C (PUBChem, 2020). Apresenta dois valores de pKa, sendo o mais ácido igual a 13,68 e o mais básico igual a 0,2 (DRUGBANK, 2020).

A curva de perfil térmico obtido por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) do benznidazol apresenta dois eventos, com o pico de fusão (endotérmico) em 191,3 °C e sua degradação em 240 °C, como mostrado na **Figura 5** (MAXIMIANO, 2010). O benznidazol pode ser recristalizado, sendo possível observar um pico exotérmico em 118,0 °C, correspondente a esse evento.

Figura 5 – Curva DSC do fármaco benznidazol.



Fonte: Maximiano (2010).

O benznidazol possui um coeficiente de partição octanol-água ($\log P$) igual a 0,91, o que caracteriza esta molécula como ligeiramente hidrofóbica. Sua solubilidade em água é superior a 39 $\mu\text{g/mL}$ (PUBChem, 2020). A **Tabela 1** apresenta a solubilidade deste fármaco em diversos solventes. Nota-se sua baixa solubilidade em água e sua ligeira solubilidade em acetonitrila.

A farmacodinâmica do benznidazol ainda não está totalmente elucidada. Acredita-se que as nitroredutases reduzam o grupo nitro presente na molécula do fármaco em grupo amino. Logo em seguida, há a formação de um intermediário radicalar, catalisada pelo citocromo P450 (CYP450). Em seguida é formada a hidroxilamina (R-NHOH). O radical nitro formado é responsável pela ação tripanocida, por meio de ligações covalentes com moléculas vitais do parasita, como proteínas, lipídeos, DNA e RNA. Essas ligações covalentes causam danos nessas macromoléculas, provocando a morte do parasita (DAVANÇO, 2015). É descrito também um aumento da morte dos tripanosomas através do interferon-gama, que leva a uma lise celular (DRUGBANK, 2020).

**Tabela 1 – Solubilidade do benznidazol em diferentes solventes.
Entre parênteses encontra-se o desvio padrão.**

Solvente	Solubilidade (mg/mL)	Classificação Experimental	Monografia FB 6
Água destilada	0,327 (0,012)	Muito pouco solúvel	Praticamente insolúvel em água
Acetato de etila	3,550 (0,092)	Muito pouco solúvel	-
Acetona	30,546 (0,249)	Ligeiramente solúvel	-
Acetonitrila	24,741 (2,866)	Ligeiramente solúvel	-
Clorofórmio	1,499 (0,267)	Muito pouco solúvel	-
Diclorometano	3,138 (0,192)	Pouco solúvel	-
Etanol	4,989 (0,359)	Pouco solúvel	Muito pouco solúvel
Fluido entérico	0,244 (0,012)	Muito pouco solúvel	-
Fluido gástrico	0,236 (0,004)	Muito pouco solúvel	-
Hexano	0,141 (0,048)	Muito pouco solúvel	-
Isopropanol	1,940 (0,130)	Pouco solúvel	Muito pouco solúvel
Metanol	13,078 (2,240)	Ligeiramente solúvel	Pouco solúvel
Octanol	0,530 (0,024)	Muito pouco solúvel	-
Óleo de amêndoas	0,029 (0,001)	Praticamente insolúvel	-
Óleo Mineral	0,003 (0,001)	Praticamente insolúvel	-

Legenda: FB 6 – Farmacopeia Brasileira 6ª edição.

Fonte: Adaptado de Maximiano (2010).

O benznidazol apresenta biodisponibilidade oral igual a 91,7%. A concentração plasmática máxima ($C_{m\acute{a}x}$) varia de 2,2 a 2,8 $\mu\text{g/mL}$, atingida após 3 a 4 h ($T_{m\acute{a}x}$) da administração de uma dose de 100 mg (RAAFLAUB; ZIEGLER, 1979). Sua meia vida de eliminação é igual a 13,27 h. Sua excreção ocorre primariamente na urina (DRUGBANK, 2020). Apresenta volume de distribuição igual a 39,19 L e um *clearance* de 2,04 L/h. Sua taxa de ligação às proteínas plasmáticas está entre 52 e 59%, segundo WORKMAN *et al.* (1984). O metabolismo é realizado pelas enzimas do CYP 450 e pela nitroreduases do *T. cruzi* (DRUGBANK, 2020).

O Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) é o único laboratório no mundo a fabricar as apresentações do fármaco benznidazol na forma de comprimidos. Até o ano de 2012, somente uma apresentação do benznidazol estava disponível: comprimidos de 100 mg, de liberação imediata. Devido à necessidade de menor dosagem para crianças, o LAFEPE lançou o primeiro comprimido pediátrico na dosagem de 12,5 mg (DAVANÇO, 2015).

A dose de benznidazol indicada para adultos é de 5 a 7 mg/kg/dia, durante 60 dias ou com três administrações diárias (DAVANÇO, 2015).

2.3 Preparo de Amostras

Os fluidos biológicos, como saliva, urina, sangue, plasma e outros, permitem a obtenção de diversas informações corporais, que são úteis nas análises toxicológicas, ambientais, forense, de *dopping*, na determinação da farmacocinética de fármacos, intoxicações, e na obtenção de informações genéticas (SAITO *et al.*, 2002). Também permite a obtenção de informações sobre a adesão do paciente à farmacoterapia, biodisponibilidade do fármaco, interações medicamentosas e funcionamentos dos órgãos (FU; LIAO; LIU, 2005). Cada matriz possui suas particularidades e seus próprios desafios: o plasma contém grande quantidade de fosfolípidos, a urina possui alta concentração de sais, o sangue total contém hemácias que precisam sofrer lise (VAGHELA *et al.*, 2016).

As referidas amostras biológicas apresentam matrizes complexas, com a presença de diversos componentes, como sais, ácidos, bases, proteínas e outras substâncias que podem ter propriedades físico-químicas similares ao analito de interesse, o que dificulta a análise (FU; LIAO; LIU, 2005). Essa interferência da matriz na análise do composto de interesse é definida como efeito de matriz e consiste na sua própria influência na amostra, independentemente da presença ou não do analito ou da quantidade extraída (PAVLOVIĆ *et al.*, 2007).

Para a obtenção de uma análise mais fidedigna e confiável, torna-se necessário remover potenciais interferentes, pré-concentrar o analito de interesse, uma vez que o analito frequentemente está presente nessas matrizes em baixas concentrações, e fornecer um método robusto e reproduzível, que seja independente de variações da matriz (PAVLOVIĆ *et al.*, 2007). Também pode ser necessário preparar o analito para que ele se torne mais adequado para a separação ou a detecção (NOVÁKOVÁ; VLČKOVÁ, 2009).

Mesmo contando com técnicas analíticas com alta detectabilidade e seletividade, como o acoplamento entre a Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) e a Espectrometria de Massas (MS, do inglês, *Mass Spectrometry*), ainda é, geralmente, necessária uma etapa de preparo de amostras, a fim de eliminar potenciais interferentes, pré-concentrar o analito e remover compostos que possam danificar o equipamento de análise (FU; LIAO; LIU, 2005). Proteínas, por exemplo, podem precipitar quando em contato com a fase móvel utilizada na cromatografia a líquido de alta eficiência, causando entupimento na coluna ou na tubulação, levando a um aumento de pressão do sistema, deterioração da coluna e, conseqüentemente, ineficiência de separação. A deterioração da coluna pela introdução de proteínas ao sistema cromatográfico também pode ser causada pela adsorção irreversível destas à fase estacionária (NOVÁKOVÁ; VLČKOVÁ, 2009).

Contudo, a etapa de preparo de amostras pode ocupar até 80% do tempo de análise e é responsável pela maior parte dos erros (FU; LIAO; LIU, 2005).

Nesse contexto, técnicas e métodos automatizados e que diminuam o tempo de análise constituem o objetivo para uma análise exata e precisa.

Em se tratando de métodos bioanalíticos, a etapa de preparo de amostras é indispensável. Somando-se à complexidade da amostra e a baixa concentração que se encontra o analito, os fármacos também podem sofrer instabilidade nestas matrizes, bem como os metabólitos ou pró-fármacos. Eles podem ser afetados pela temperatura, pH, presença de enzimas, anticoagulantes e outros fármacos, ou até mesmo pelo ciclo de congelamento e descongelamento da amostra. Essa instabilidade pode ocorrer durante todas as etapas de desenvolvimento e performance do método, na própria matriz antes da análise, na extração ou na amostra já acondicionada nos *vials*. É necessário, portanto, realizar um estudo de estabilidade, de curto e longo prazo, pois a degradação do fármaco durante o preparo de amostra pode culminar em concentrações mais baixas do analito ou mais altas dos produtos de degradação (NOVÁKOVÁ; VLČKOVÁ, 2009).

Os métodos bioanalíticos geralmente são aplicados na análise de grandes quantidades de amostras. Portanto, análises rápidas e com baixos níveis de quantificação são necessários. Consequentemente, os métodos bioanalíticos devem ser desenvolvidos de maneira a serem rápidos, efetivos e sensíveis, preenchendo os requisitos contidos na legislação pertinente (NOVÁKOVÁ; VLČKOVÁ, 2009).

Nesse âmbito, as técnicas de preparo de amostra mais utilizadas são aquelas chamadas de convencionais, quais sejam: a remoção de proteínas, a extração líquido-líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*) e a extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid-Phase Extraction*). Cada uma dessas técnicas tem suas particularidades, que serão abordadas nas seções a seguir.

Objetivando diminuir o tempo gasto na etapa de preparo de amostras, bem como desenvolver métodos mais sustentáveis, vêm sendo desenvolvidas diversas técnicas miniaturizadas. Essas técnicas visam ainda a automatização desta etapa e um aumento da eficiência de extração e de concentração do analito (NOVÁKOVÁ; VLČKOVÁ, 2009).

Diversas são as técnicas miniaturizadas, que podem ser baseadas em solventes ou sorventes: microextração em fase sólida (SPME), microextração líquido-líquido (LLME), extração líquido pressurizada (PLE), microextração por sorvente empacotado (MEPS), e extração sortiva por barra magnética (SBSE), dentre outras. O principal objetivo é diminuir a quantidade de amostra e de solventes utilizados, o tempo da análise, bem como promover a automação (NOVÁKOVÁ; VLČKOVÁ, 2009).

A seguir serão abordadas cada uma das técnicas convencionais e algumas técnicas miniaturizadas, a fim de elucidar as vantagens e desvantagens de cada uma e justificar a escolha do método de preparo de amostras utilizado neste projeto.

2.3.1 Remoção de proteínas

A remoção de proteínas é uma das técnicas mais antigas, mas ainda muito utilizada, devido à sua simplicidade de execução. Considerando que o plasma e o soro sanguíneo contêm cerca de 10 mil diferentes proteínas, atingindo uma concentração de 6 a 8 g/dL de conteúdo proteico, a incompatibilidade destas proteínas com os sistemas cromatográficos e detectores, e sua natureza não-volátil, é necessário removê-las antes de inserir a amostra no equipamento analítico (CHANG *et al.*, 2007).

A remoção de proteínas pode ser feita por ultrafiltração ou por precipitação das proteínas. No caso da precipitação de proteínas, a interação entre partes da proteína com o reagente (solventes orgânicos, ácidos ou sais), seja direta ou indiretamente, provoca uma diminuição da solubilidade da proteína, culminando em sua precipitação (CHANG *et al.*, 2007).

As proteínas solúveis usualmente possuem uma superfície hidrofílica envolvendo um núcleo mais hidrofóbico. A superfície hidrofílica geralmente contém grupos iônicos livres, que não fazem ligações intramoleculares. Dessa

forma, é possível a utilização de sais concentrados a fim de mudar o estado de ionização dessas partes da proteína (CHANG *et al.*, 2007).

A utilização de sais no manejo da solubilidade proteica é complexa. Em baixas concentrações (abaixo de 1,0 mol/L), o resultado é um aumento da solubilidade da proteína, em um efeito chamado *salting-in* (TIMASHEFF; ARAKAWA, 1988), que consiste na interação dos sais com as moléculas proteicas, diminuindo a interação entre elas e favorecendo a solubilidade. Entretanto em concentrações elevadas, a solubilidade diminui, devido ao efeito *salting-out* (TIMASHEFF; ARAKAWA, 1988), onde o sal adicionado à solução “sequestra” as moléculas de água que hidratam a proteína, devido à natureza iônica do sal, o que faz com que a proteína, com sua porção hidrofóbica, tenda a se agregar para diminuir o gasto energético no meio. Essa agregação leva à precipitação das proteínas presentes no meio (TIMASHEFF; ARAKAWA, 1988).

Com relação à utilização de solventes como agente precipitantes, é notável que o uso de solventes miscíveis em água como etanol, acetona ou acetonitrila causam a precipitação das proteínas presentes na solução. Esse efeito é causado pela diminuição da constante dielétrica, que aumenta a força das interações entre os grupos iônicos presentes na superfície das proteínas. Os solventes miscíveis em água se associam mais fortemente com a água em si do que com as proteínas, o que leva a uma desidratação das superfícies proteicas. (VAGHELA *et al.*, 2016).

A utilização de ácidos para a precipitação de proteínas é justificada pela interação das bases conjugadas provenientes desses ácidos com grupos carregados positivamente na estrutura da proteína. É relatada também uma desnaturação provocada por esses agentes precipitantes, culminando na perda da estrutura tridimensional da proteína, irreversivelmente (VERAS *et al.*, 2013).

Após a etapa de adição do solvente ou sal precipitante, a amostra é centrifugada, de forma a aumentar a velocidade de agregação das partículas, decantar o precipitado proteico e obter um sobrenadante límpido (VAGHELA *et al.*, 2016). A técnica de filtração também pode ser utilizada para remover o precipitado, com o uso de filtros de tamanho e porosidade apropriada para a

retenção dessas macromoléculas. Pode-se utilizar também a refrigeração para diminuir ainda mais a solubilidade das proteínas, favorecendo uma remoção por precipitação (CHANG *et al.*, 2007). É importante ressaltar que proteínas de menor tamanho e com menor tendência de agregação podem permanecer no sobrenadante (CHANG *et al.*, 2007).

O sobrenadante pode ser acondicionado em *vials*, prontos para injeção no sistema cromatográfico, ou podem ser evaporados e reconstituídos em outro solvente, por exemplo, a fase móvel que será utilizada na cromatografia (VAGHELA *et al.*, 2016).

As vantagens da técnica de remoção de proteínas são: baixo custo, remoção do conteúdo proteico indesejado, ser compatível com pequenos volumes de solvente e simplicidade de execução (VAGHELA *et al.*, 2016). Entretanto, apresenta baixa seletividade, baixa recuperação do analito e pode alterar a resposta em espectrometria de massas. Além disso, pode ser necessário utilizar grandes volumes de solvente, dependendo da amostra e do analito.

Devido à simplicidade da técnica, diversos métodos bioanalíticos para determinação de benznidazol descritos na literatura utilizam a precipitação de proteínas. Guerrero *et al.* (2011) e Pinazo *et al.* (2013) utilizaram ácido tricloroacético (0,3 mol/L) como agente precipitante para análises de benznidazol em plasma humano, sendo que Guerrero obteve uma recuperação média de 98,7%. De forma similar, Marson *et al.* (2013) utilizaram o mesmo reagente para precipitação de proteínas para análise de benznidazol em amostras de leite materno. Altcheh *et al.* (2014) utilizaram plasma liofilizado, reconstituído com acetato de etila com remoção de proteínas com ácido tricloroacético (TCA) como agente precipitante. Davanço; De Campos; Peccinini (2015) também empregaram a técnica de precipitação de proteínas para análise de benznidazol em plasma humano, porém utilizando acetonitrila como agente precipitante. Workman *et al.* (1984) utilizaram metanol como agente precipitante em estudo elucidativo da farmacocinética do benznidazol. Entretanto, técnicas mais elaboradas, com obtenção de extratos mais limpos e recuperações mais altas,

foram utilizadas para análise de benznidazol em fluidos biológicos, como veremos a seguir.

2.3.2 Extração líquido-líquido

A técnica de extração líquido- líquido também é bastante antiga e ainda amplamente usada. Ela baseia-se no princípio de partição do analito entre dois solventes imiscíveis, geralmente denominadas fase aquosa e fase orgânica.

Em um procedimento de LLE tradicional, o solvente orgânico ou extrator precisa ser vigorosamente agitado após sua adição à fase aquosa, que geralmente é a matriz biológica, de forma a aumentar a superfície de contato e obter maiores recuperações. Após a agitação, o solvente orgânico pode ser evaporado e a amostra reconstituída com fase móvel, para melhor aplicação e eficiência de resultado, bem como adequabilidade ao sistema cromatográfico (TANG; WENG, 2013).

A LLE pode ser utilizada para aumentar a seletividade, uma vez que a migração de um analito da fase aquosa para a fase orgânica permite que os interferentes com características hidrofílicas sejam removidos, uma vez que eles permanecem na fase aquosa segundo a sua afinidade (SILVESTRE *et al.*, 2009).

A transferência do soluto entre a fase orgânica e a fase aquosa pode ser favorecida pela adição de agentes que permitam a separação de fases ou mesmo por meio de reações químicas, como a complexação (BARRETO, 2007), que aumentará ou reduzirá sua solubilidade na fase aquosa, tornando possível a sua separação por esta técnica.

Vários critérios devem ser observados antes de proceder a uma extração líquido-líquido, dentre eles a escolha de solvente ou co-solventes, pH do sistema, tempo de extração, intensidade de agitação e número de extrações (PENA-PEREIRA; LAVILLA; BENDICHO, 2009). A escolha do solvente apropriado deve levar em consideração a seletividade e a solubilidade do solvente, a

recuperabilidade, o coeficiente de distribuição (K_D), a densidade, a tensão interfacial e a toxicidade do solvente (MACHADO, 2007).

A LLE e, como veremos a seguir, a extração em fase sólida, fornecem extratos mais limpos, com menos interferentes da matriz, do que a remoção de proteínas, uma vez que esta última concentra-se unicamente na remoção de conteúdos proteicos e não em moléculas similares ao analito que possam interferir na análise (TANG; WENG, 2013).

Entretanto, a LLE apresenta algumas limitações como formação de emulsão, uso de grandes volumes de amostra, uso de solventes tóxicos e com alta grau de pureza, baixas recuperações, baixa seletividade e exposição do analista aos solventes (PENA-PEREIRA; LAVILLA; BENDICHO, 2009).

São encontrados na literatura alguns trabalhos onde a extração líquido-líquido foi utilizada na etapa de preparo de amostras para a determinação de benznidazol. Como exemplos pode-se citar os trabalhos de Marsón *et al.* (2013) e Martínez *et al.* (2015), que empregaram LLE para extração de benznidazol em amostras de urina, utilizando diclorometano como solvente extrator. Marsón *et al.* realizaram a extração líquido-líquido após precipitação de proteínas com ácido tricloroacético (TCA). Da Silva *et al.* (2012) utilizaram éter etílico como solvente extrator em LLE convencional na extração de benznidazol em plasma humano. Já Leonardi; Bombardiere; Salomon (2013) utilizaram a técnica de extração líquido-líquido com acetonitrila e dimetilsulfóxido (DMSO), com incubação em ácido tricloroacético, para extração de benznidazol, em formulações com ciclodextrinas, em plasma de ratos. Morilla *et al.* (2003) utilizaram o mesmo método que Leonardi, porém para análise de formulações lipossomais. Bedor *et al.* (2018) utilizaram a combinação de duas técnicas, sendo elas, a mancha de sangue seco (*dried blood spot*), seguida de extração líquido-líquido convencional com 1% de ácido fórmico em diclorometano, para a análise de benznidazol em plasma humano. Marson *et al.* (2020) também utilizaram a extração líquido-líquido para extração de benznidazol em urina, porém após a etapa de extração enzimática com β -glucuronidase e desproteinização com ácido tricloroacético. A LLE neste caso foi realizada com diclorometano e sulfato

de sódio anidro. Como último exemplo, cita-se o trabalho desenvolvido por Bulffer, Castro, Fanelli (2011), que utilizaram um dispositivo denominado Extrelut da empresa Merck, que consiste em uma coluna utilizada para simplificar extrações líquido-líquido, de maneira a substituir os funis de separação. Empregando este dispositivo, com diclorometano como solvente extrator, eles extraíram benznidazol em plasma de ratos, em que foram administrados o fármaco em uma suspensão com carboximetilcelulose.

A fim de diminuir o uso e descarte dos solventes tóxicos, tornando a técnica mais sustentável, e também para obter recuperações mais elevadas, surgiram técnicas miniaturizadas da LLE, que reduziram drasticamente os volumes de solvente e amostra utilizados. As principais técnicas miniaturizadas são: microextração de gota única (SDME, do inglês *single-drop microextraction*), microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME, do inglês *liquid phase microextraction with hollow fiber*) e a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, do inglês *dispersive liquid-liquid microextraction*) (PENA-PEREIRA; LAVILLA; BENDICHO, 2009).

A SDME é uma técnica que se baseia no poder de extração de uma gota de solvente, que é exposta à solução amostra, seja por uma pequena fase orgânica de menor densidade que a fase aquosa ou por extração no *headspace*, se os analitos apresentarem volatilidade suficiente (PENA-PEREIRA; LAVILLA; BENDICHO, 2009).

Na HF-LPME utiliza-se uma fibra oca feita de material hidrofóbico, que protege e expõe uma quantidade de solvente orgânico à amostra. O solvente orgânico é imobilizado nos poros da fibra oca, local onde ocorre efetivamente a extração (PENA-PEREIRA; LAVILLA; BENDICHO, 2009).

A DLLME, além de utilizar quantidades menores de solvente orgânico e amostra, também utiliza um solvente dispersivo, que deve ser miscível em ambas as fases. Dessa forma, pequenas gotículas do solvente extrator são carregadas para a fase aquosa, pelo solvente dispersivo, aumentando a superfície de contato, bem como a eficiência de extração (PENA-PEREIRA; LAVILLA; BENDICHO, 2009).

Padró *et al.* (2013) utilizaram a DLLME com líquidos iônicos para extração de benznidazol em plasma humano, utilizando metanol como solvente dispersivo e cloreto de potássio para aumentar a eficiência de extração, obtendo recuperação de 97,6 %. A utilização de líquidos iônicos na técnica de DLLME permite a substituição de solvente extratores clorados por estes líquidos, que apresentam baixa volatilidade, baixa toxicidade e estabilidade térmica (MOREIRA; YOKOYA; GAITANI, 2014).

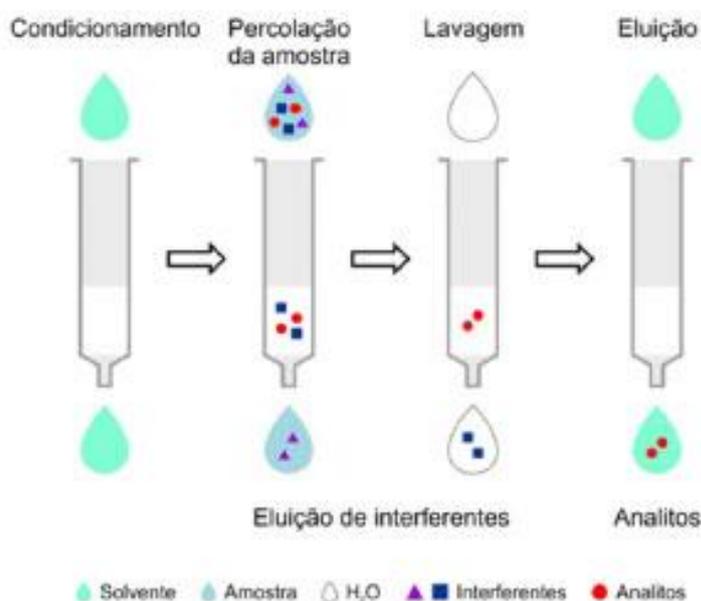
Apesar de ser uma técnica amplamente utilizada, o consumo de solventes na extração líquido-líquido gera grande impacto ambiental, além de preocupação com a exposição do analista a tais solventes. Desta forma, uma alternativa a esta técnica é a extração em fase sólida, discutida a seguir.

2.3.3 Extração em Fase Sólida convencional

A técnica denominada extração em fase sólida foi inspirada na tecnologia empregada na cromatografia líquida, na qual se utiliza uma fase estacionária para promover a separação de compostos e uma fase móvel que carrega o analito (LI; RIVORY; CLARKE, 2006).

O procedimento do preparo de amostra pela técnica de extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid-phase extraction*) consiste em quatro etapas: condicionamento, aplicação da amostra, remoção de interferentes e eluição, como mostrado na **Figura 6** a seguir:

Figura 6 – Procedimento padrão da técnica de Extração em Fase Sólida (SPE).



Fonte: Caldas *et al.* (2011)

A etapa de condicionamento visa ativar e preparar o sorvente para receber a amostra. Para tanto, um solvente apropriado é aplicado no cartucho (CHEN *et al.*, 2009). Esse solvente é posteriormente removido pela aplicação de um outro solvente, que seja similar à amostra. Em métodos bioanalíticos, por exemplo, água purificada é utilizada de modo a mimetizar a amostra biológica.

Em seguida, é realizada a etapa de aplicação da amostra, na qual uma quantidade determinada pelo analista como melhor condição, é aplicada sobre o cartucho. Durante a passagem da amostra, os compostos com afinidade pelo sorvente são retidos e aqueles que não apresentam nenhuma afinidade pela fase sólida passam diretamente pelo cartucho, já iniciando a separação de interferentes.

Posteriormente, os interferentes são removidos em uma etapa, chamada de lavagem (*clean-up*), pela aplicação de solventes fracos, que apresente afinidade pelos interferentes e que sejam capazes de eluí-los da fase sólida, sem dessorver o(s) analito(s) de interesse (CHEN *et al.*, 2009).

Por fim, os analitos de interesse são desorvidos por um solvente mais forte na etapa de eluição (CHEN *et al.*, 2009). O solvente escolhido para esta etapa deve possuir afinidade grande o suficiente pelo(s) analito(s) de interesse para que ele(s) tenha(m) preferência pela fase líquida (solvente extrator) à fase sólida (sorvente). O eluato é então recolhido e pode ser injetado em sistema cromatográfico, ou mesmo ser evaporado e reconstituído em fase móvel.

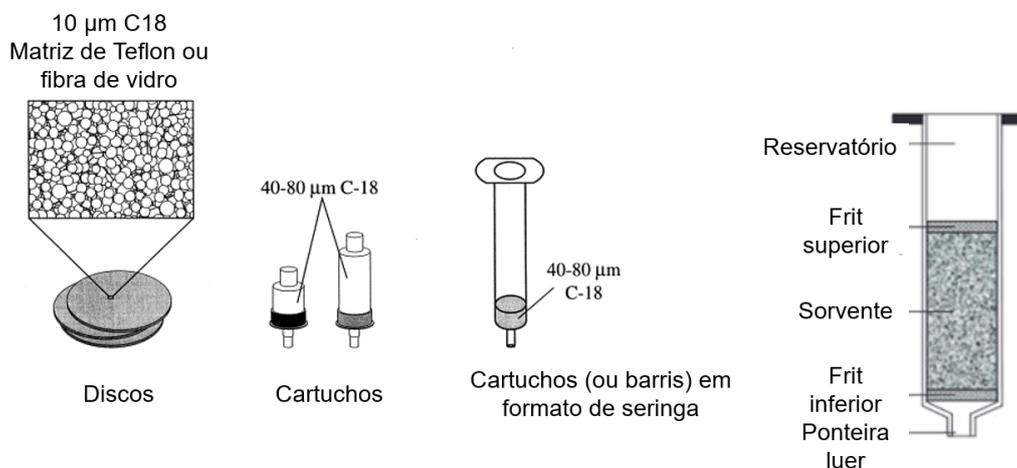
O princípio que rege a SPE é bastante similar ao princípio de separação cromatográfica. O analito entra pelo cartucho a partir da aplicação da solução amostra e interage com o sorvente na fase sólida, chamada estacionária, e com o solvente da amostra. As interações são regidas pelas forças intermoleculares de van der Waals, dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio ou ligações iônicas, de acordo com os grupos funcionais presentes no analito, no sorvente e no solvente que carrega a amostra (LI; RIVORY; CLARKE, 2006).

O mecanismo de interação do analito pode ser por partição ou adsorção. A partição ocorre quando o analito penetra os poros do sorvente, se particionando na fase sólida, interagindo com esta por diversos pontos ou grupos funcionais presentes em sua estrutura. A adsorção ocorre quando o analito interage somente superficialmente com a fase sólida, em poucos pontos de sua molécula (DORSEY; DILL, 1989).

Os sorventes mais tradicionais, geralmente à base de sílica, polímeros ou resina, estão disponíveis em cartuchos, como o da **Figura 7**. Suas aplicações vão desde análises de fármacos e metabólitos, a compostos iônicos e de alta polaridade, difíceis de extrair por LLE, por exemplo (LI; RIVORY; CLARKE, 2006).

O cartucho, feito de polipropileno, contém o sorvente empacotado e *frits* em suas duas extremidades. Os *frits* são discos de polietileno, de pequeno diâmetro, que impedem a passagem do material sólido para a solução, imobilizando-os para uma extração mais efetiva.

Figura 7 – Dispositivos utilizados em SPE convencional.



Fonte: Adaptado de Thurman; Snavely (2000).

Os cartuchos de SPE disponíveis comercialmente apresentam diferentes tamanhos e formatos, com diferentes quantidades de materiais sorventes empacotados, cabendo ao analista a decisão da melhor escolha para sua amostra.

Outro formato de SPE disponível são discos, que surgiram como alternativa aos cartuchos, em análises onde é necessário isolar e pré-concentrar analitos de amostras ambientais de alto volume. O procedimento e princípio são os mesmos do cartucho, o que muda é o tipo de empacotamento do sorvente e a estrutura das partículas, cujos tamanhos são bem menores do que as partículas do cartucho; enquanto o diâmetro das partículas no disco é de 8 µm, no cartucho, o diâmetro é de 40 µm (PŁOTKA-WASYLKA *et al.*, 2016).

Outro formato de SPE utilizado são pontas de pipeta, no qual o sorvente é empacotado na ponta de ponteiros de plástico. Os analitos são extraídos por meio de sucessivas aspirações e ejeções da amostra, seja em ponteiros usuais ou multicanais. Este formato apresenta as vantagens de utilizar pequenas quantidades de material sorvente e, portanto, de menor volume de solvente, o que diminui o custo da técnica. Além disso, não necessita etapa de evaporação e reconstituição do solvente e pode ser aplicado diretamente no sistema

cromatográfico ou no espectrômetro de massas (PŁOTKA-WASYLKA *et al.*, 2016).

Uma alternativa mais recente, com vistas à automação, são as placas multi-poços de SPE, com apresentações de 96, 384 e 1536 poços. Cada poço possui cartuchos de SPE de 0,65 a 2,5 mL, com até 200 mg de material sorvente. O material sorvente pode ser fracamente empacotado ou incorporado a um disco. Tais placas podem apresentar os cartuchos de SPE fixos ou flexíveis. As placas fixas possuem volume e massa de sorvente definidos e iguais para todas as placas. Entretanto, o fluxo, o volume e a massa entre os poços apresentam alta variabilidade, além de pouca durabilidade, o que aumenta o custo da técnica. Já nas placas flexíveis, as colunas de sorvente são removíveis, o que facilita a intercambialidade entre volumes e massas diferentes (PŁOTKA-WASYLKA *et al.*, 2016).

Existe uma grande variedade de materiais sorventes e sua escolha depende do analito que se deseja extrair e suas propriedades físico-químicas (LI; RIVORY; CLARKE, 2006). Assim como colunas cromatográficas, existem hoje no mercado sorventes com maior ou menor polaridade, materiais de troca iônica, materiais de acesso restrito, monolitos, imunosorventes, materiais poliméricos, grafenos, dentre outros (CHEN *et al.*, 2009). A maioria destes sorventes está disponível comercialmente, enquanto outros, por serem mais exclusivos, ainda permanecem feitos em laboratórios, em pequena escala. Na **Tabela 2**, encontram-se alguns dos principais sorventes aplicados aos diferentes tipos de matrizes:

Tabela 2 – Exemplos de sorventes utilizados em SPE e suas aplicações nos tipos matrizes

Modo	Sorvente	Matriz/Amostra
Não polar	C18, C8, C6, C4, C2, PH, CH, CN	Aquosa
Polar	CN, Si, NH, 2OH	Não polar
Troca catiônica	SCX, PRS, DEA	Aquosa
Troca aniônica	SAX, NH ₂ , PSA, DEA	Aquosa
Modo misto	C8 + SCX, C8 + SAX, Oasis HLB	Aquosa

Legenda: CBA – ácido carboxílico (WCX); DEA – dietilaminopropil; NH₂ – aminopropil; Oasis HLB – poli(divinilbenzeno-co-N-vinilpirrolidona); PH – fenil; PRS – ácido propilsulfônico (SCX – forte troca catiônica); PSA – amina primária/secundária; SAX – forte troca iônica.

Fonte: Adaptado de Li; Rivory; Clarke (2006).

As separações por modos e fase estacionária apolares são aplicáveis a compostos lipofílicos, nos quais predominam as interações hidrofóbicas do tipo van der Waals. Os sorventes mais comuns são o octadecilsilano, também conhecido como C18, e o octacil, conhecido como C8 (CHEN *et al.*, 2009). Existem também cartuchos com C18 capeados (*end-capped*), utilizados para diminuir ou extinguir a carga de grupos silanóis residuais, que pode afetar a eficiência de separação. Copolímeros de poliestireno com divinilbenzeno também são utilizados em separações de compostos apolares, como alternativa aos sorventes à base de sílica que são susceptíveis à variação de pH. Além disso, essa resina polimérica apresenta maior hidrofobicidade, aumentando a interação e, conseqüentemente, a separação dos analitos lipofílicos (LI; RIVORY; CLARKE, 2006).

Os sorventes utilizados no modo de extração polar interagem com os grupos funcionais dos analitos principalmente por ligações de hidrogênio ou interações dipolo-dipolo. Nos sorventes, os principais grupos responsáveis por essas interações são os grupos silanóis da sílica, grupos amino, diol e

cianopropil. É importante se atentar para o pH nesse tipo de extração, uma vez que os grupos ionizáveis podem fornecer menor ou maior interação se carregados, implicando em diferentes valores de recuperação. Para aumentar a adsorção dos analitos na fase polar, é necessário que o solvente carreador da amostra tenha natureza apolar, o que complica análises de amostras biológicas aquosas, como plasma e urina, sendo necessária uma etapa prévia de extração líquido-líquido (LI; RIVORY; CLARKE, 2006).

Sorventes de troca iônica são aplicáveis a analitos polares, que tenham grupos ionizáveis em sua molécula, e a separação ocorre por meio de interações iônicas. Para esse modo de extração, é importante considerar o pKa dos analitos de interesse, bem como o pH do meio, que pode facilitar ou impedir a ionização dos grupos funcionais. Os principais sorventes aniônicos são aminas quaternárias e aminopropil, enquanto os principais catiônicos são ácidos sulfônicos ou carboxílicos (LI; RIVORY; CLARKE, 2006). Chen *et al* (2009) relatou alta porosidade e alta permeabilidade destes materiais sorventes, apresentando alta eficiência de separação e bom uso para extrações em fase sólida *on-line*.

Materiais não convencionais têm recebido atenção nos últimos anos e demonstrado serem úteis como sorventes em extração em fase sólida. Li *et al* (2015) utilizaram dendrímeros ligados a partículas de sílica mesoporosa em modo misto para troca aniônica para análises de fármacos em urina, obtendo boa recuperação e reprodutibilidade (PŁOTKA-WASYLKA *et al.*, 2016). Os dendrímeros são macromoléculas poliméricas e esféricas, altamente funcionalizadas, usadas principalmente em *drug-delivery*, mas também com aplicações em SPE (PŁOTKA-WASYLKA *et al.*, 2016).

Nanotubos de carbono com uma ou múltiplas paredes também são utilizados como sorventes em SPE, para adsorção de metais iônicos, compostos orgânicos e organometálicos (CHEN *et al.*, 2009).

Nanopartículas magnéticas têm sido empregadas como sorventes em SPE, para análise de traços de metais, separação de células e isolamento de proteínas (PŁOTKA-WASYLKA *et al.*, 2016), bem como análises ambientais,

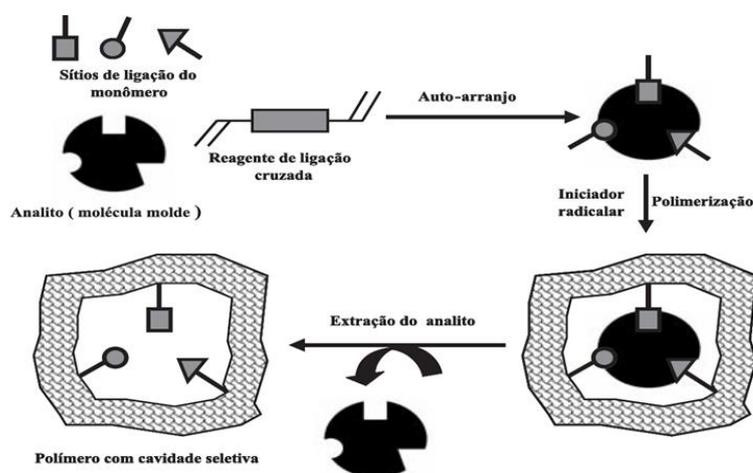
alimentícias, de fármacos e extração de biomoléculas (WIERUCKA; BIZIUK, 2014). Como exemplo, tem-se o trabalho desenvolvido em nosso grupo utilizando nanopartículas de sílica mesoporosa recobertas com Fe_3O_4 como sorvente para extração em fase sólida magnética para análise de fármacos antidiabéticos em plasma humano (DE SOUZA *et al.*, 2014). A fase sólida magnética é colocada em contato com os analitos de interesse por meio de solução ou suspensão, e o material sólido, adsorvido com os analitos, são separados da solução por um campo magnético externo. As nanopartículas magnéticas apresentam menor tempo de execução na etapa de preparo de amostra, maior superfície de contato, maior capacidade de sorção e maior seletividade (PŁOTKA-WASYLKA *et al.*, 2016).

Existem também sorventes de materiais de acesso restrito (RAM, do inglês *restricted access material*), para exclusão de macromoléculas, a partir do princípio de exclusão por tamanho. Dessa forma, somente pequenas moléculas são capazes de infiltrar nos poros e interagir com a fase sólida, enquanto macromoléculas são lavadas com solvente. Sorventes RAM apresentam a vantagem de serem duradouros, podendo ser utilizados por até 2000 vezes. Entretanto, essa durabilidade vem com um alto custo (CHEN *et al.*, 2009). Nosso grupo de pesquisa já desenvolveu trabalho com colunas RAM comerciais e preparadas no próprio laboratório para a análise de estatinas em plasma humano (FAGUNDES *et al.*, 2014).

Imunossorventes apresentam uma alternativa com alta seletividade, uma vez que seu mecanismo de chave-fechadura é restrito ao encaixe somente do seu substrato ou substâncias análogas quimicamente. Os imunossorventes são anticorpos ligados à sílica usual e empacotados como sorventes de SPE. Os anticorpos de baixo peso molecular apresentam menor seletividade do que os de maiores pesos, podendo extrair moléculas semelhantes ao substrato, o que é chamado de reatividade cruzada. Essa característica está sendo explorada e utilizada para extrair substâncias estruturalmente relacionadas (CHEN *et al.*, 2009).

Contudo, os imunossorventes apresentam baixa estabilidade físico-química e térmica, além de dificuldade de obtenção. Como alternativa a estes materiais, surgiram os polímeros molecularmente impressos (MIP, do inglês *Molecularly Imprinted Polymers*), cujo esquema do processo produtivo é apresentado abaixo na **Figura 8**.

Figura 8 – Esquema de síntese dos Polímeros Molecularmente Impressos (MIPs).



Fonte: Tarley; Sotomayor; Kubota (2005).

Os MIPs são sintetizados a partir de uma molécula molde, que geralmente é o analito. Os monômeros são escolhidos de forma a interagirem com o maior número de grupos funcionais do analito e, então, é adicionado um agente de ligação cruzada (*crosslinker*) e o iniciador radicalar para que a síntese do polímero aconteça em volta da molécula molde e suas ligações com o monômero. Por fim, a molécula molde é retirada por um solvente porogênio, resultando em um polímero com cavidade seletiva para aquele analito, na mesma forma, tamanho e sítios de ligação que a molécula de interesse (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005).

Dessa forma, obtém-se um material físico, químico e termicamente mais estável que os imunossorventes, mantendo a seletividade do material, através do reconhecimento chave-fechadura, além de menor custo. O uso em SPE é chamado MISPE, extração em fase sólida molecularmente impressa (do inglês,

Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction), e apresenta aplicação para uma gama de analitos, obtendo bons resultados de recuperação para analitos em baixas concentrações ou matrizes muito complexas (CHEN *et al.*, 2009).

Recentemente, dois métodos empregando MISPE para determinação de lumefantrina e gliclazida foram desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa, demonstrando a seletividade destes materiais (DA SILVA *et al.*, 2018; VASCONCELOS *et al.*, 2020).

Em relação às técnicas de remoção de proteínas e extração líquido-líquido, a SPE apresenta as vantagens de utilizar menor quantidade de solvente, o que implica maior sustentabilidade, maior facilidade de automação, ausência de emulsões, pouco manuseio da amostra, menor custo de mão de obra e menor tempo de análise, além de obtenção de extratos mais limpos e análise de traços enriquecidos.

2.3.4 Extração em Fase Sólida miniaturizada

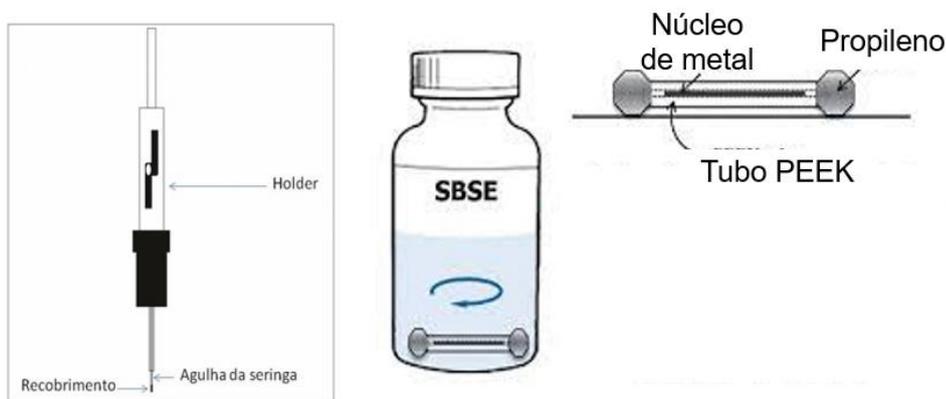
Assim como a extração líquido-líquido, técnicas miniaturizadas de SPE foram desenvolvidas objetivando o menor uso de solventes e amostra, rapidez na análise, uso de menores quantidade de sorventes e maior pré-concentração do analito. As principais técnicas miniaturizadas em SPE são a microextração em fase sólida (SPME, do inglês *Solid-Phase Microextraction*), extração sortiva por barra magnética (SBSE, do inglês *Stir Bar Sorptive Extraction*) e microextração por sorvente empacotado (MEPS, do inglês *Microextraction by Packed Sorbent*).

A SPME utiliza uma seringa com uma fibra (**Figura 9**), geralmente de sílica fundida, que é recoberta por um material adsorvente, onde ocorrerá a extração do analito. Pode-se mergulhar a seringa diretamente na amostra, para extração dos analitos, o que é chamado de DI-SPME (*direct immersion – SPME*), ou expor a fibra sortiva no *headspace* para extração de analitos voláteis e de baixo peso molecular, a chamada HS-SPME (*headspace-SPME*). A SPME

apresenta a vantagem de desorver o uso de solvente extrator e realizar a amostragem e pré-concentração em uma única etapa. Dessa forma, pode-se dispensar o analito retido na fase sólida diretamente no instrumento analítico. Entretanto, apresenta desvantagens como baixa recuperação do analito, rápida deterioração da fibra e impossibilidade de uso de solventes orgânicos (ABDEL-REHIM, 2004).

Diversos materiais sorventes são utilizados para recobrir a fibra, sendo os polímeros os mais utilizados; mas também são empregados fio de aço inoxidável, sol-gel, MIPs e líquidos iônicos. As fibras disponíveis comercialmente abrangem uma série de compostos, mas possuem baixa estabilidade química, térmica e mecânica (LUIZ; MACIEL; LANÇAS, 2015). Uma alternativa é a técnica *in-tube* SPME, no qual o material extrator (sorvente) é colocado dentro de um tubo capilar, que pode ser acoplado na agulha de injeção do cromatógrafo, por exemplo (LI; RIVORY; CLARKE, 2006).

Figura 9 – Dispositivos usados na Microextração em Fase Sólida (SPME) e na Extração Sortiva por Barra Magnética (SBSE).



Fonte: Adaptado de Luiz; Maciel; Lanças (2015) e Liu et al. (2020).

Uma outra abordagem para a SPME é a microextração em fase sólida dispersiva ($D-\mu$ SPE), na qual o material sorvente é dispersado na solução amostra, em pequenas quantidades, aumentando a superfície de contato e realizando uma extração em *bulk*. Ao final, os analitos são desorvidos por um

solvente, como em uma SPE convencional (CHISVERT; CÁRDENAS; LUCENA, 2019).

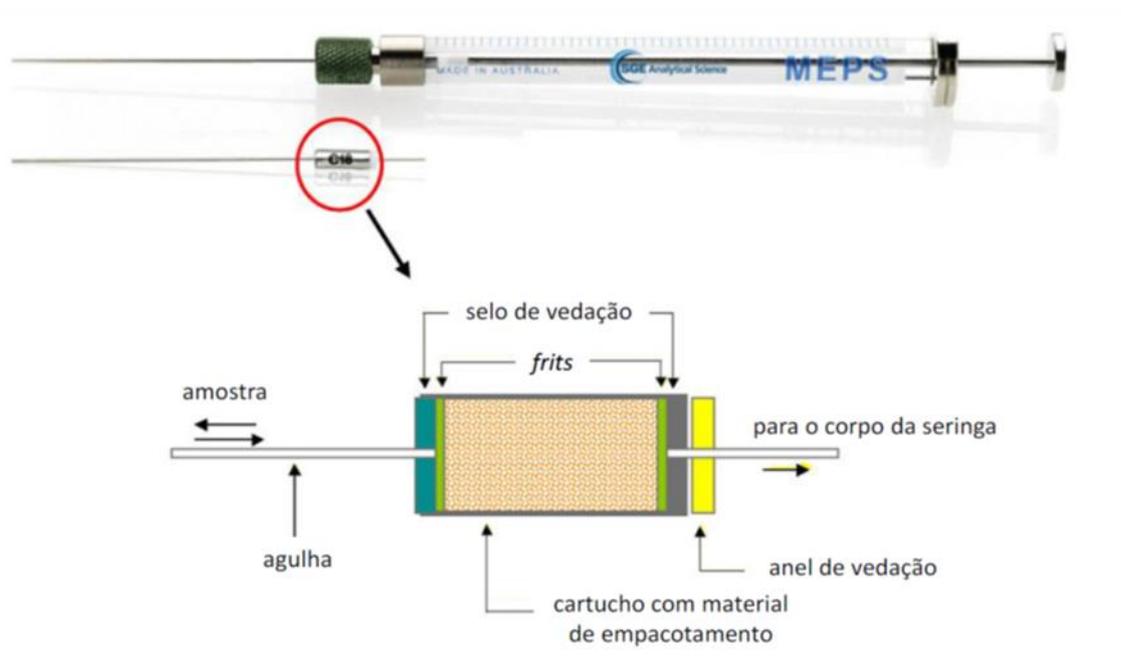
A SBSE é realizada, como o próprio nome sugere, em uma barra magnética. Esta barra magnética é recoberta por material sorvente, geralmente polidimetilsiloxano (PDMS), e pode ser utilizada por imersão na solução amostra ou mesmo no *headspace*, se o analito apresentar volatilidade alta o suficiente para extração. Analitos com baixa polaridade apresentam melhor interação e sorção com o PDMS. A SBSE apresenta as vantagens de utilizar maior quantidade de material sorvente e maior superfície de contato. Os analitos podem ser dessorvidos por solvente ou por calor - para aplicações em cromatografia gasosa (LUIZ; MACIEL; LANÇAS, 2015).

A técnica MEPS, empregada neste estudo, utiliza quantidades bem pequenas de material sorvente (de 1 a 2 mg), que é colocado dentro de uma seringa. A amostra é aspirada e ejetada algumas vezes para a extração dos analitos de interesse. Diversos sorventes podem ser utilizados nesta técnica, desde os mais comuns, como C8, C18 e sílica, até os mais modernos, como os polímeros molecularmente impressos (LUIZ; MACIEL; LANÇAS, 2015). Esta técnica será melhor detalhada na seção a seguir.

2.3.5 Microextração por Sorvente Empacotado (MEPS)

A miniaturização da técnica de Extração em Fase Sólida denominada Microextração por Sorvente Empacotado (MEPS) consiste na redução da quantidade de material sorvente para 1 a 2 mg, empacotado em um cartucho que é acoplado a uma seringa de 100 a 250 μL . O cartucho e a seringa que compõem a extração por MEPS está apresentado na **Figura 10**, assim como um esquema do interior do cartucho.

Figura 10 – Cartucho e Seringa MEPS.



Fonte: Adaptado de Abdel-Rehim (2010).

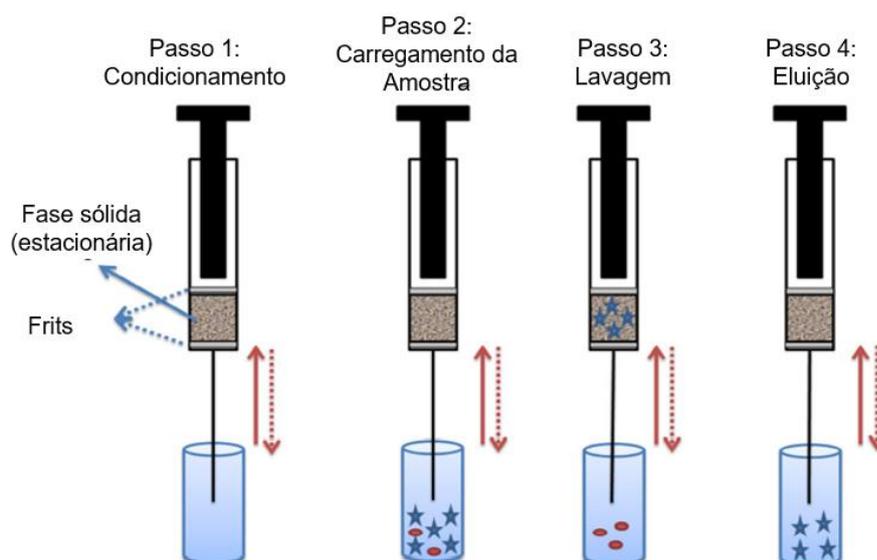
Os cartuchos disponíveis comercialmente são produzidos com os sorventes comumente usados em SPE e em colunas cromatográficas, como sílica, sílica modificada com C18 ou C8, troca iônica ou com fases mistas. Em uma escala menor, produzidas principalmente no meio acadêmico, também utilizam-se resinas poliméricas, MIPs, nanotubos de carbono, dentre outros materiais. O cartucho, cuja constituição é semelhante ao cartucho de SPE convencional, possui dois frits (na entrada e saída do cartucho) para impedir a passagem da fase sólida para a seringa, além de um anel de selagem, popularmente chamado de *O-ring*, para que não haja perda de material na junção.

O acoplamento do cartucho à seringa é facilmente realizado. Além disso, a seringa permite a injeção diretamente no sistema cromatográfico, podendo funcionar em modo *on-line* ou *off-line* (MOEIN; ABDEL-REHIM; ABDEL-REHIM, 2015). Comercialmente, já existem disponíveis seringas de 100 μL , 250 μL e 500 μL , além de dispositivos semi-automáticos ou completamente automatizados.

Além da possibilidade de automação, a preparação de amostra com MEPS permite a pré-concentração do analito de interesse em pequenos volumes (de 10 a 100 μL), controlando-se a vazão de fluxo (MOEIN; ABDEL-REHIM; ABDEL-REHIM, 2015), o que favorece o aumento da recuperação do analito e maior detectabilidade do método.

O procedimento utilizado em MEPS é similar ao procedimento utilizado em SPE, porém reduzindo-se o volume e sem a necessidade de sistema de vácuo para passagem da amostra. O esquema apresentado na **Figura 11** demonstra o procedimento empregado na MEPS.

Figura 11 – Procedimento da Microextração por Sorvente Empacotado.



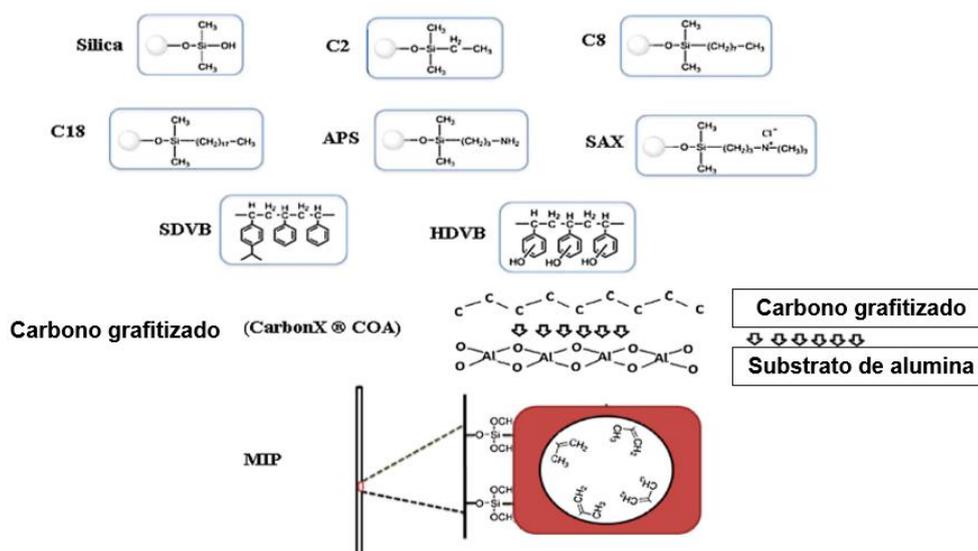
Fonte: Adaptado de Yang; Said; Abdel-Rehim (2017).

Semelhantemente à SPE, o cartucho da MEPS deve ser inicialmente condicionado para ativação do sorvente. A etapa de condicionamento é realizada, geralmente, com a aplicação de um solvente orgânico, usualmente, metanol. Devido à incompatibilidade das amostras biológicas com solventes orgânicos, além da redução que estes solventes podem causar na recuperação do analito, pois competem com a fase estacionária, é realizada uma lavagem do

solvente condicionante com água ou algum solvente mais parecido com a amostra.

Em seguida, procede-se à aplicação da amostra que irá interagir com a fase estacionária presente no cartucho. Esta fase estacionária pode ser de fase normal, fase reversa, troca iônica, mista ou mesmo imunossorventes, Polímeros Molecularmente Impressos (MIPs), poliestireno-divinilbenzeno ou carbono grafiteado (YANG; SAID; ABDEL-REHIM, 2017). O tamanho médio de partícula dos sorventes em MEPS é de 30 a 50 μm (MOEIN; ABDEL-REHIM; ABDEL-REHIM, 2015). A **Figura 12** apresenta as estruturas dos diferentes materiais sorventes utilizados em MEPS.

Figura 12 – Estruturas dos sorventes mais comumente utilizados em MEPS.



Legenda: APS – aminopropil siloxano; C2 - etil; C8 - octil; C18 - octadecil; HDVB – poliestireno divinilbenzeno altamente reticulado (*Highly cross-linked polystyrene DiVinylBenzene*); MIP – Polímero Molecularmente Impresso; SAX – troca aniônica forte (*Strong Anion Exchange*); SDVB – poliestireno divinilbenzeno.

Fonte: Adaptado de Yang; Said; Abdel-Rehim (2017).

É importante salientar que amostras biológicas muito viscosas ou concentradas podem requerer um tratamento prévio a fim de evitar a saturação

do cartucho por componentes concentrados na matriz, diminuindo seu tempo de vida útil, bem como a eficiência do cartucho. Este tratamento pode ser uma diluição, uma precipitação de proteínas, centrifugação, filtração, dentre outros (MOEIN; ABDEL-REHIM; ABDEL-REHIM, 2015). No caso de diluição, Moein; Abdel-Rehim; Abdel-Rehim (2015) sugerem uma diluição de pelo menos 1:4 em amostras de plasma e urina e pelo menos 20 vezes em caso de amostra de sangue total.

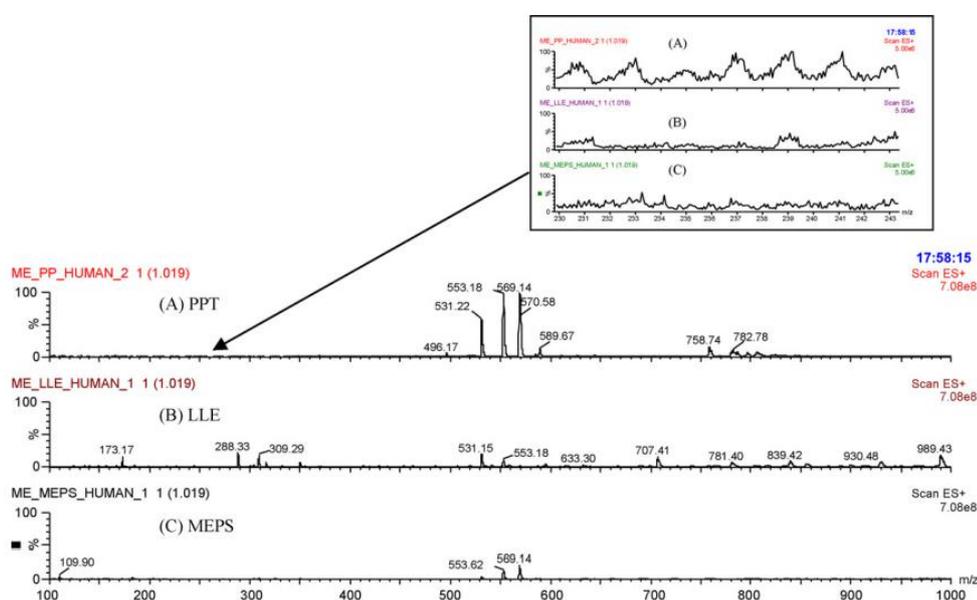
A amostra é então aspirada e ejetada pela seringa, em volume previamente definido pelo analista, para permitir que o analito de interesse, adsorva ou particione na fase estacionária do cartucho, segundo a sua afinidade. Diferentemente da SPE, na MEPS a amostra é aspirada e ejetada diversas vezes, para maximizar a retenção do analito, enquanto na SPE a amostra é aplicada em uma única direção (YANG; SAID; ABDEL-REHIM, 2017). Moein; Abdel-Rehim; Abdel-Rehim (2015) relatam a possibilidade de extração por MEPS reaplicando a mesma amostra diversas vezes ou aplicando e descartando as alíquotas para otimização.

Contudo, interferentes de polaridade parecida ou mesmo diferentes podem também ficar retidos no cartucho. Portanto, é necessária uma etapa de lavagem com a utilização de um solvente fraco, que desorva os interferentes, sem desorver o analito de interesse. Após a etapa de lavagem, o analito é então desorvido, com solvente adequado à sua polaridade e que favoreça a sua migração da fase estacionária para a fase móvel, que neste caso é o solvente de desorção.

A redução da quantidade de amostra aplicada, bem como do volume de solventes, associada à própria técnica de MEPS, permite a obtenção de extratos mais limpos, além da pré-concentração do analito. Abdel-Rehim (2010), em seu estudo sobre preparo de amostras, fez um comparativo entre as técnicas de precipitação de proteínas (PPT), extração líquido-líquido (LLE) e MEPS, analisando uma amostra branco de sangue humano, utilizando cartucho C18 e espectrometria de massas por ionização electrospray. O autor observou que o cromatograma do extrato obtido por meio do MEPS apresentou-se mais limpo

que o extrato obtido por LLE que, por sua vez, apresentou-se mais limpo que o extrato obtido por PPT. Ele relata que a PPT eliminou grande parte de íons fosfolipídeos, mas a LLE conseguiu reduzir ainda mais. A técnica de MEPS, além de reduzir a concentração de fosfolipídeos, ainda reduziu o ruído na análise por espectrometria de massas. Os cromatogramas obtidos nas três técnicas estão apresentados na **Figura 13**.

Figura 13 – Cromatogramas de amostra branco de sangue humano obtidos pelas técnicas de PPT, LLE e MEPS.



Fonte: Rehim (2010).

Moein; Abdel-Rehim; Abdel-Rehim (2015) relatam que o cartucho pode ser reutilizado até 100 vezes sem perda de performance, se utilizadas amostras de plasma centrifugadas. Para amostras de plasma obtidas sem centrifugação, seu uso pode durar até 50 extrações. É importante também observar o pH da amostra para evitar a deterioração do cartucho, principalmente daqueles à base de sílica. Entretanto, para manutenção e durabilidade do cartucho, assim como evitar efeitos residuais (os chamados *carry-over*), após cada amostra processada é necessária a realização de uma etapa de lavagem que, segundo os desenvolvedores dos cartuchos comerciais, deve ser aplicada de 3 a 4 vezes água para completa eliminação de resíduos polares e 4 a 5 vezes do solvente orgânico adequado para remoção do analito.

A melhor condição de extração por MEPS depende da matriz analisada, da seletividade do sorvente, assim como da afinidade do analito pela fase estacionária. Moein; Abdel-Rehim; Abdel-Rehim (2015) salientam que a melhor condição não necessariamente é aquela que apresenta maior recuperação, mas sim a que apresenta extratos mais limpos e, conseqüentemente, menor interferência.

As principais vantagens obtidas pelo preparo de amostra por meio da MEPS são: ampla aplicação de analitos e matrizes; menor quantidade de material sorvente; menor volume de solventes orgânicos, gerando maior sustentabilidade; reutilização dos cartuchos, o que leva a menor custo; e eliminação da etapa de pré-concentração, uma vez que a dessorção em pequenos volumes já garante a concentração do analito (MOEIN; ABDEL-REHIM; ABDEL-REHIM, 2015).

Entretanto, a MEPS também apresenta algumas desvantagens como facilidade de obstrução por entupimento por amostras viscosas ou muito concentradas. A aplicação de amostras de grande volume também não é vantajosa, pois seria necessário a aplicação da mesma amostra diversas vezes para extração de todo o volume (MOEIN; ABDEL-REHIM; ABDEL-REHIM, 2015). Ademais, como a quantidade de sorvente é reduzida, geralmente a recuperação obtida é baixa, quando comparada com aquela obtida com a SPE convencional.

A MEPS tem sido empregada com sucesso na análise de fármacos em matrizes biológicas. Na literatura são encontrados muitos trabalhos onde essa técnica é empregada. Em nosso grupo de pesquisa, Viana *et al.* (2014) realizaram a extração simultânea de fármacos da classe das sulfonilureias empregando MEPS. Mais recentemente, em 2014, foi desenvolvido e validado método para determinação de lumefantirna e seu metabólito desbutil-lumefantrina em amostras de plasma humano (SIQUEIRA, FERNANDES e CÉSAR, 2020). Apesar da grande aplicação de MEPS na área farmacêutica, para análise de fármacos, drogas de abuso, biomarcadores e novos fármacos

(PEREIRA *et al.*, 2019), ainda não há estudos utilizando a Microextração por Sorvente Empacotado como preparo de amostra para análise de benznidazol.

2.4 Métodos analíticos para a determinação de benznidazol em amostras biológicas

Na literatura, são encontrados alguns métodos para a determinação de benznidazol em amostras biológicas. Na **Tabela 3**, são apresentados os métodos encontrados nas bases de dados *Science Direct*, *Scielo* e *Google Acadêmico*, no período de 1984 a 2020, destacando-se as técnicas de preparo de amostras, separação e detecção empregados, bem como as recuperações obtidas.

Tabela 3 – Métodos encontrados na literatura para determinação de benznidazol.

Autor	Amostra Biológica	Preparo de amostra	Solvente	Volume de Amostra	Padrão Interno	Seperação/ Detecção	Limite de Quantificação	Recuperação do BZN
WORKMAN <i>et al.</i> (1984)	Urina, sangue e tecidos de ratos, cães e ovelhas	PPT e ultrafil-tração	MeOH	NR	1-(2-nitroimidazol-1-il)-3-etóxiopropan-2-ol	HPLC/UV	0,2 µg/mL	NR
MORILLA <i>et al.</i> (2003)	Plasma, sangue e tecidos de ratos	PPT	ACN:DMSO (1:1) e incubação com de TCA 10% (p/v)	200 µL	NR	HPLC/UV	0,75 µg/mL	94% sangue 86% plasma 97% fígado 70% baço 90% pulmões
BULFFER; CASTRO; FANE (2011)	Sangue humano	LLE em coluna Extrelut®	DCM	1 mL	NR	HPLC/UV	0,5 µg/mL	94%
GUERRERO <i>et al.</i> (2011)	Plasma humano	PPT	TCA 0,3 M	150 µL	Benzocaína	HPLC/UV	1,6 µg/mL	98,73%
DA SILVA <i>et al.</i> (2012)	Plasma de ratos	LLE e filtração	Etil-éter	300 µL	Diazepam	HPLC/UV	0,5 µg/mL	92,46%
LEONARDI; BOMBARDIERE; SALOMON (2013)	Plasma de ratos	PPT	ACN:DMSO (1:1) e incubação com	200 µL	NR	HPLC/UV	NR	NR

de TCA 10% (p/v)								
MARSON <i>et al.</i> (2013)	Leite materno	PPT	TCA 30% v/v	1000 µL	NR	HPLC/UV	0,9 µg/mL	70%
MARSÓN <i>et al.</i> (2013)	Plasma humano e urina	PPT (plasma) e LLE (urina)	TCA 30% p/v (PPT) TCA 30% p/v e DCM (LLE)	2 mL	NR	HPLC/UV	0,32 µg/mL	89% (PPT) e 70% (LLE)
PADRÓ <i>et al.</i> (2013)	Plasma Humano	PPT e IL-DLLME	TCA 30% (v/v) e MeOH e KCl (IL-DLLME)	1 mL	NR	HPLC/UV	0,1 µg/mL	78,9%
PINAZO <i>et al.</i> (2013)	Plasma humano	PPT	TCA 0,3 M	150 µL	Benzocaína	HPLC/UV	NR	NR
ALTCHEH <i>et al.</i> (2014)	Plasma liofilizado	PPT	TCA 30% v/v	1 mL	NR	HPLC/UV	0,32 µg/mL	NR
DAVANÇO; DE CAMPOS; PECCININI (2015)	Plasma de ratos	PPT	ACN	50 µL	Benzocaína	UHPLC/ UV	0,15 µg/mL	65,5%
MARTÍNEZ <i>et al.</i> (2015)	Urina humana	LLE	DCM	2,5 mL	NR	UHPLC-MS/MS	4,85 µg/L	95,5%
I. MOLINA <i>et al.</i> (2017)	Soro humano	LLE com evapo-ração e reconstituição	Etil acetato	50 µL	NR	UHPLC-MS/MS	0,1 µg/mL	NR

PERIN <i>et al.</i> (2017)	Plasma e tecidos de ratos	LLE	Etil acetato	100 µL	Omeprazol	HPLC/UV	0,1 µg/mL	NR
BEDOR <i>et al.</i> (2018)	Sangue humano	Mancha de sangue seco e LLE	DCM acidificado com 1% de ácido fórmico	50 µL	Bromidrato de citalopram	HPLC-MS/MS	0,5 µg/mL	NR
MARSON <i>et al.</i> (2020)	Urina humana	Reação enzimática com β-glucuronidas e, seguida de PPT e LLE	TCA 30% (p/v) e DCM	5 mL	NR	HPLC-MS/MS	NR	NR

Legenda: PPT – ACN – Acetonitrila; DCM – Diclorometano; IL-DLLME – Microextração Líquido-Líquido Dispersiva por Líquidos Iônicos; KCl – Cloreto de Potássio; LLE – Extração Líquido-Líquido; MeOH – Metanol; NR – Não Relatado; Precipitação de Proteínas; TCA – Ácido Tricloroacético.

A partir da análise dos métodos apresentados na **Tabela 3**, infere-se que, dos 17 trabalhos encontrados, a grande maioria utiliza a precipitação de proteínas como preparo de amostra, separação por HPLC e detecção por ultravioleta. O ácido tricloroacético é o principal reagente utilizado como agente precipitante. Alguns trabalhos empregaram a LLE como preparo de amostra, utilizando, principalmente, diclorometano como fase orgânica extratora. Há apenas um trabalho que utiliza uma técnica miniaturizada para o preparo de amostra, sendo ela a IL-DLLME. E nenhum trabalho utiliza extração em fase sólida, seja ela convencional ou miniaturizada.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar método bioanalítico para determinação de benznidazol em plasma humano, utilizando microextração por sorvente empacotado (MEPS) e cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) com detecção por espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta.

3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar método analítico por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) com detecção por espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta para análise de benznidazol;
- Desenvolver método por microextração por sorvente empacotado, empregando planejamento experimental, para extração de benznidazol a partir de amostras de plasma humano;
- Desenvolver e validar método bioanalítico, empregando MEPS e cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE-UV), para análise de benznidazol;
- Aplicar o método validado na determinação de benznidazol em amostras de plasma de voluntários.

4 MATERIAIS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Farmácia da UFMG (FaFar), sendo que a coleta das amostras biológicas foi realizada no Laboratório de Hematologia da FaFar.

4.1 Insumos Farmacêuticos Ativos (IFAs) e comprimidos de benznidazol

O Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) de benznidazol foi gentilmente cedido pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE). Os lotes cedidos foram 603218 e 17710, com teor de 100,2%.

Os comprimidos de benznidazol (100 mg) também foram gentilmente doados pelo LAFEPE (lote 20030012, com validade até março/2023).

4.2 Substâncias Químicas de Referência (SQRs)

As Substâncias Químicas de Referência (SQR) utilizadas no desenvolvimento e na validação do método bioanalítico foram:

- acetaminofeno SQR USP, lote: J-1;
- benzocaína SQR USP, lote: J1G214. Pureza: 100,0%;
- cafeína SQR USP, lote: K0D372. Fornecido pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED);
- L-Nicotina SQR Acros Organics, lote: A0333681, teor: 99,0%.

4.3 Reagentes e Soluções

Os reagentes que foram utilizados no desenvolvimento e validação do método analítico estão listados abaixo:

- acetato de sódio anidro P.A., da Neon Comercial Ltda. Teor: 99,70%;
- acetonitrila, grau cromatográfico, da J. T. Baker;
- ácido acético, da Sigma Aldrich. Teor \geq 99,8%;
- ácido tricloroacético, da Êxodo Científica. Teor: 99%;
- água ultrapurificada;
- metanol, grau cromatográfico, da Scharlau.

4.3.1 Soluções estoque e de trabalho

A solução estoque de benznidazol, na concentração de 1 mg/mL, foi preparada pesando-se, exatamente cerca de, 10 mg de benznidazol IFA, que foram transferidos, quantitativamente, para balão volumétrico de 10,00 mL. Adicionaram-se 2 mL (20% v/v) de acetonitrila para completa solubilização do fármaco e completou-se o volume com água ultrapurificada. A solução foi submetida a banho ultrassom por 10 minutos e homogeneizada.

A solução de trabalho de benznidazol foi preparada na concentração de 20 μ g/mL. Um mL da solução estoque de benznidazol foi adicionada a um balão volumétrico de 50,00 mL. Adicionaram-se 5 mL (10% v/v) de acetonitrila, para garantir a solubilização do fármaco, e completou-se o volume com água ultrapurificada. Homogeneizou-se e transferiu-se uma alíquota de 1 mL para vial âmbar.

4.4 Equipamentos e Dispositivos

Os equipamentos e dispositivos utilizados neste trabalho estão listados a seguir:

- aparelho de ultrassom Unique, modelo 1400;
- balança analítica Shimadzu com precisão de 0,01 mg;
- balões volumétricos de 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 mL;

- béqueres de 25, 50, 100, 200, 600, 1000 e 2000 mL;
- cartucho MEPS (*Barrel Insert and Needle - BIN's*) SGE Analytical Science C18. Lote: L07-A0664;
- centrífuga Eppendorf, modelo 5424 R;
- centrífuga Thermo, modelo MR23;
- coluna cromatográfica Luna (Phenomenex) C18 – 150 mm x 4,60 mm x 5 μ m;
- cromatógrafo a líquido de alta eficiência Agilent 1200, composto de bomba quaternária, desgaseificador, injetor automático, forno para coluna e detector de arranjo de diodos (DAD);
- filtros de seringa PVDF de 13 mm de diâmetro e tamanho de poro de 0,45 μ m;
- frascos tipo *vial* com tampa de rosca e septos de silicone;
- frascos *vial* do tipo *recovery* com tampa de rosca e septos de silicone;
- micropipetas de 10, 200 e 1000 μ L;
- pipetas de Pasteur;
- ponteiros de 10, 200 e 1000 μ L para uso em micropipetas;
- potenciômetro METROHM 827 pH Lab;
- pré-coluna Phenomenex;
- refrigerador GELOPAR, com temperatura de 2 °C;
- seringa MEPS SGE Analytical Science 250 μ L. Lote: 006292;
- sistema de purificação de água Millipore, modelo Direct Q3;
- software Design Expert v. 10;
- software Excel 2013;
- tubos Falcon de 15 mL;
- tubos para coleta de plasma de 9 mL contendo heparina sódica;
- tubos tipo eppendorf 2 mL;
- ultrafreezer Coldlab, modelo CL374-80;
- ultrapurificador de água MILLIPORE DIRECT Q3;
- vórtex Mini FlexVortex, modelo 3800.

5 MÉTODOS

5.1 Desenvolvimento do método analítico por HPLC para análise de benznidazol IFA

5.1.1. Método cromatográfico

O método analítico por HPLC foi otimizado tomando-se como referência o método proposto por Silva *et al.* (2007). As condições empregadas após otimização foram as seguintes: coluna Luna C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm); fase móvel composta por água e acetonitrila na proporção de 60:40; vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção de 20 µL; temperatura do forno a 25 °C; e detecção em 316 nm.

5.2 Validação do método analítico por HPLC para análise de benznidazol

A validação do método analítico foi realizada baseada na RDC 166/2017 da ANVISA e nos trabalhos de De Souza; Junqueira; Ginn (2005); De Souza; Pinto; Junqueira (2007); e Souza (2007). Os parâmetros validados foram linearidade, precisão (nas condições de repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

5.2.1 Linearidade

Para avaliação da linearidade foi preparada solução estoque em concentração igual a 500 µg/mL, pesando-se exatamente cerca de 25 mg e transferindo-se quantitativamente para balão volumétrico de 50,00 mL. A solução estoque foi diluída de forma a obter concentrações em seis níveis, conforme apresentado na **Tabela 4**. Os experimentos foram aleatorizados no preparo das soluções e novamente aleatorizados para a injeção no sistema cromatográfico.

Tabela 4 – Diluições realizadas para avaliação da linearidade do método analítico.

Concentração Teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Diluição
1,0	20 μL em 10 mL
10,0	200 μL em 10 mL
20,0	400 μL em 10 mL
30,0	600 μL em 10 mL
40,0	800 μL em 10 mL
50,0	1000 μL em 10 mL

Avaliou-se então, a partir das áreas sob a curva obtidas pelos cromatogramas, a significância do modelo linear e a falta de ajuste por meio da Análise de Variância (ANOVA). A linearidade foi avaliada pelo método dos mínimos quadrados ordinários, com a identificação e devida exclusão dos *outliers* pelo método de Jackknife e avaliação dos resíduos por meio da normalidade, empregando o método de Ryan-Joiner, homoscedasticidade, pelo método de Brown-Forsythe, e da independência, pelo método de Durbin-Watson.

A linearidade é considerada aprovada, segundo a RDC 166/2017 da ANVISA, se apresentar coeficiente de determinação (r^2) acima de 0,990 e o coeficiente angular for diferente de zero.

5.2.2 Precisão

Para avaliação da repetibilidade ou precisão intracorridas (ou intradia) foram definidas três concentrações: baixa (1 $\mu\text{g/mL}$), média (25 $\mu\text{g/mL}$) e alta (50 $\mu\text{g/mL}$). Foram preparadas triplicatas de cada nível, pelo mesmo analista, em uma única corrida analítica.

A precisão intermediária foi avaliada nos mesmos níveis de concentração, em triplicata, porém por dois analistas diferentes, em dias distintos.

Ambas as precisões, repetibilidade e intermediária, foram avaliadas por meio do cálculo de desvio padrão relativo (DPR). Os critérios de aceitação foram estabelecidos com base no trabalho de Souza (2007), no qual aplicou-se a função de Horwitz, de acordo com a concentração analisada.

5.2.3 Exatidão

Para avaliação da exatidão do método, foram determinadas as recuperações de seis replicatas nas concentrações baixa, média e alta, utilizadas no ensaio de precisão. As recuperações devem estar entre 98,0 e 102,0% (GREEN, 1996).

5.2.4 Limites de Detecção e de Quantificação

Os limites de detecção e de quantificação foram determinados por meio da equação da reta média, obtida pelas curvas analíticas, com o emprego das equações abaixo:

$$LD = \frac{3 \times DP}{a}$$

$$LQ = \frac{10 \times DP}{a}$$

Sendo, LD o limite de detecção, LQ o limite de quantificação, DP o desvio padrão do intercepto e a a inclinação da reta.

5.2.5 Robustez

A robustez foi determinada, arbitrariamente, variando-se a proporção da fase móvel, a temperatura do forno e a vazão de fase móvel. A proporção da

fase móvel foi avaliada em 58% de água e 42% de acetonitrila e em 62% de água e 48% de acetonitrila. A temperatura do forno foi avaliada em 20 °C e em 35 °C. E a vazão foi variada para 0,9 mL/min e 1,1 mL/min. A robustez foi avaliada pelos DPRs das áreas obtidas.

5.3 Desenvolvimento do método bioanalítico para análise de benznidazol em plasma humano

5.3.1 Amostras biológicas

As amostras de plasma foram obtidas por meio de coleta realizada no Laboratório de Hematologia da Faculdade de Farmácia da UFMG, sendo dividida em dois grupos: indivíduos não usuários de benznidazol (grupo 1) e indivíduos usuários de benznidazol (grupo 2). Ambos os grupos de voluntários receberam e assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG, sob número de protocolo 26669419.3.0000.5149. O parecer do COEP encontra-se no **Anexo I**.

Os voluntários do grupo 1 realizaram a coleta de sangue em jejum de 8 horas para obtenção de plasma branco. As amostras de plasma lipêmico foram obtidas em coletas pós-prandiais. Para obtenção do plasma hemolisado, realizou-se agitação vigorosa de amostras selecionadas. Os voluntários do grupo 2, indivíduos saudáveis que fizeram uso de benznidazol somente para este trabalho, tomaram uma única dose de benznidazol, conforme o peso relatado, após leve desjejum. Segundo a bula fornecida pelo LAFEPE, a dose para adultos é de 5 a 7 mg/kg de peso corporal e as concentrações plasmáticas máximas são observadas após 2 horas. Assim, a coleta de sangue dos indivíduos do grupo 2 foi realizada 2 horas após a administração do medicamento. O volume de sangue coletado de cada voluntário, de ambos os grupos, foi igual a 30 mL. Este material foi coletado em tubos de 9 mL contendo heparina.

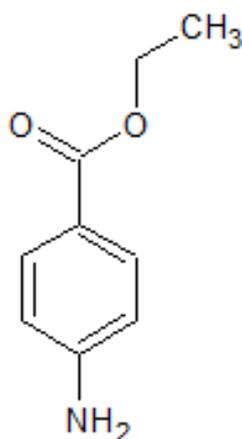
As amostras foram então submetidas à centrifugação a 1431,36 x g por 10 minutos a 4 °C, para separação do plasma. Em seguida, foram transferidas

para tubos do tipo Falcon de 15 mL e armazenados a -50 °C em ultrafreezer até o momento da análise.

5.3.2 Seleção de Padrão Interno

A benzocaína apresenta estrutura química (**Figura 14**), e características físico-químicas (logP 1,86 e pKa 2,51) semelhantes ao benznidazol, sendo uma escolha adequada para o padrão interno.

Figura 14 – Estrutura Química do Padrão Interno Benzocaína.



5.3.3 Desenvolvimento do método bioanalítico

O método bioanalítico foi desenvolvido baseado no método analítico desenvolvido anteriormente. Considerando-se o volume de amostras e solvente reduzidos, assim como a faixa de concentração plasmática do benznidazol, preparou-se as soluções estoque e de trabalho para o benznidazol e padrão interno conforme descrito a seguir.

Solução estoque de benznidazol 1 mg/mL: pesaram-se, exatamente cerca de, 10 mg de IFA de benznidazol e transferiu-se, quantitativamente, para balão

volumétrico de 10,00 mL. Adicionaram-se 2 mL (20% v/v) de acetonitrila para completa solubilização do fármaco e completou-se o balão com água ultrapurificada. A solução foi submetida a banho ultrassom por 10 minutos e homogeneizada.

Solução estoque de benzocaína 1 mg/mL: pesaram-se, exatamente cerca de, 10 mg de IFA de benzocaína e transferiu-se, quantitativamente, para balão volumétrico de 10,00 mL. Adicionaram-se 2 mL (20% v/v) de acetonitrila para completa solubilização do fármaco e completou-se o balão com água ultrapurificada. A solução foi submetida a banho ultrassom por 10 minutos e homogeneizada.

Solução de trabalho de benznidazol e benzocaína 20 µg/mL: adicionou-se 1 mL da solução estoque de benznidazol mais 1 mL de solução estoque de benzocaína a um balão volumétrico de 50,00 mL. Adicionaram-se 5 mL (10% v/v) de acetonitrila, para garantir a solubilização dos fármacos, e completou-se o balão com água ultrapurificada. Homogeneizou-se.

Solução de trabalho de benznidazol e benzocaína 5 µg/mL: adicionaram-se 250 µL da solução estoque de benznidazol mais 250 µL de solução estoque de benzocaína a um balão volumétrico de 50,00 mL. Adicionaram-se 5 mL (10% v/v) de acetonitrila, para garantir a solubilização dos fármacos, e completou-se o balão com água ultrapurificada. Homogeneizou-se.

5.3.4 Desenvolvimento de método de extração por MEPS

Tendo em vista a preservação do cartucho de MEPS, realizou-se uma etapa prévia de precipitação das proteínas. Esta etapa foi otimizada considerando-se o agente precipitante, a sua concentração e a proporção plasma e agente precipitante. As condições avaliadas estão descritas na **Tabela 5**.

Tabela 5 – Ensaio de otimização da etapa de precipitação de proteínas.

Agente Precipitante	Concentração do agente precipitante	Proporção plasma: agente precipitante
TCA	30% p/v	0,5:1
		1:1
		2:1
TCA	10% p/v	0,5:1
		1:1
		2:1
TCA em ACN	10% p/v	0,5:1
		1:1
		2:1
ACN	Grau cromatográfico	1:1
		2:1
		2,5:1

As soluções utilizadas na etapa de precipitação de proteínas estão descritas a seguir.

Solução de Ácido Tricloroacético 30% p/v: pesaram-se cerca de 7,5 g de ácido tricloroacético e transferiu-se quantitativamente para um balão volumétrico de 25 mL. Completou-se o balão com água ultrapurificada e homogeneizou-se.

Solução de Ácido Tricloroacético 10% p/v: pesaram-se cerca de 2,5 g de ácido tricloroacético e transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 25 mL. Completou-se o balão com água ultrapurificada e homogeneizou-se.

Solução de Ácido Tricloroacético 10% p/v em Acetonitrila: pesaram-se cerca de 2,5 g de ácido tricloroacético e transferiu-se quantitativamente para um balão volumétrico de 25 mL. Completou-se o balão com acetonitrila grau cromatográfico e homogeneizou-se.

Após a precipitação, foi realizado o preparo de amostra por MEPS, utilizando-se sorvente C18. As condições iniciais para teste em MEPS foram baseadas no trabalho de Viana *et al.* (2014).

Inicialmente, foram testadas as seguintes condições para extração de benznidazol em amostras preparadas em solvente: condicionamento com 250 μL de metanol, seguidos de 250 μL de água ultrapurificada; aplicação de 500 μL da solução padrão contendo benznidazol e benzocaína na concentração de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, em 5 ciclos de 100 μL de aspiração e ejeção; lavagem com água, aspirando e ejetando 4 ciclos de 100 μL ; e dessorção com acetonitrila em 3 ciclos de 50 μL . A etapa de lavagem entre as amostras foi realizada com 4 ciclos de 100 μL de acetonitrila, seguidos de 4 ciclos de 100 μL de água ultrapurificada.

A fim de otimizar a extração, de forma a se obter maiores recuperações, testou-se o uso de tampão acetato pH 4,0 no preparo das soluções padrão de benznidazol e benzocaína, uma vez que ambos o analito e o padrão interno, se apresentam na forma não-ionizada neste pH. Para o preparo do tampão acetato pH 4,0 0,01 mol/L, adicionaram-se 18 mL da solução acetato de sódio 0,01 mol/L e 82 mL da solução de ácido acético 0,01 mol/L em um béquer e misturou-se. Mediu-se o pH em potenciômetro previamente calibrado. Nenhum ajuste de pH se fez necessário.

Também foi realizado um teste com tampão TRIS, tris(hidroximetil)aminometano, em pH 9,0, para avaliação da extração em pH básico. O tampão TRIS 1,0 mol/L foi preparado adicionando-se 50 mL da solução TRIS 1 mol/L e 29,2 mL da solução de ácido clorídrico 1,0 mol/L em um béquer e misturou-se. Mediu-se o pH em potenciômetro previamente calibrado. Nenhum ajuste de pH se fez necessário.

Para avaliação e determinação da melhor condição de extração por MEPS foi realizado um planejamento fatorial completo 2^4 . As variáveis e os níveis otimizados estão descritos na **Tabela 6**.

Tabela 6 – Variáveis e níveis otimizados em planejamento fatorial 2^4 .

Variável	Nível		
	-1	0	+1
Volume de plasma (x_1)	500 μ L	750 μ L	1000 μ L
Número de ciclos de aspiração e ejeção (x_2)	5	10	15
Volume de acetonitrila para dessorção (x_3)	3 x 50 μ L	3 x 100 μ L	3 x 150 μ L
Volume de aspiração da amostra (x_4)	50 μ L	100 μ L	150 μ L

Foram então realizados os experimentos segundo a matriz das variáveis codificadas, dividido em dois blocos e triplicata no ponto central, conforme demonstrado na **Tabela 7**.

Tabela 7 – Matriz experimental com as variáveis codificadas para planejamento fatorial 2⁴.

Experimento	Bloco	Variáveis codificadas			
		X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
1	2	-1	-1	-1	-1
2	1	+1	-1	-1	-1
3	1	-1	+1	-1	-1
4	2	+1	+1	-1	-1
5	1	-1	-1	+1	-1
6	2	+1	-1	+1	-1
7	2	-1	+1	+1	-1
8	1	+1	+1	+1	-1
9	1	-1	-1	-1	+1
10	2	+1	-1	-1	+1
11	2	-1	+1	-1	+1
12	1	+1	+1	-1	+1
13	2	-1	-1	+1	+1
14	1	+1	-1	+1	+1
15	1	-1	+1	+1	+1
16	2	+1	+1	+1	+1
17	1	0	0	0	0
18	1	0	0	0	0
19	1	0	0	0	0
20	2	0	0	0	0
21	2	0	0	0	0
22	2	0	0	0	0

A matriz com os valores reais dos níveis de cada variável está apresentada na **Tabela 8**.

Tabela 8 – Matriz experimental com as variáveis reais para planejamento fatorial 2⁴ para otimização da extração de benznidazol por MEPS.

Experimento	Bloco	Variáveis reais			
		x ₁ (µL)	x ₂	x ₃ (µL)	x ₄ (µL)
1	2	500	5	3 x 50	50
2	1	1000	5	3 x 50	50
3	1	500	15	3 x 50	50
4	2	1000	15	3 x 50	50
5	1	500	5	3 x 150	50
6	2	1000	5	3 x 150	50
7	2	500	15	3 x 150	50
8	1	1000	15	3 x 150	50
9	1	500	5	3 x 50	150
10	2	1000	5	3 x 50	150
11	2	500	15	3 x 50	150
12	1	1000	15	3 x 50	150
13	2	500	5	3 x 150	150
14	1	1000	5	3 x 150	150
15	1	500	15	3 x 150	150
16	2	1000	15	3 x 150	150
17	1	750	10	3 x 100	100
18	1	750	10	3 x 100	100
19	1	750	10	3 x 100	100
20	2	750	10	3 x 100	100
21	2	750	10	3 x 100	100
22	2	750	10	3 x 100	100

A condição ótima obtida por meio do planejamento fatorial e utilizada na aplicação do método foi: condicionamento com 250 µL de metanol, seguidos por 250 µL de água ultrapurificada; volume de amostra igual a 500 µL; aplicação da amostra pelo cartucho MEPS em 10 ciclos de 100 µL de aspiração e ejeção; etapa de *clean-up* com dois ciclos de aspiração e ejeção de água ultrapurificada; e dessorção com três ciclos de 50 µL de acetonitrila, grau cromatográfico.

Foi realizado um estudo comparativo para determinação de benznidazol em solução utilizando-se SPE convencional. Para isto, utilizou-se cartuchos comerciais C18 Strata® e Hydra®, com volumes de 3 mL e 1 mL, respectivamente, sendo a quantidade de material sorvente igual a 500 mg para os cartuchos Strata® e igual a 100 mg para os cartuchos Hydra®. Foram aplicados 1 mL de metanol e 1 mL de água ultrapurificada para condicionamento do cartucho, seguidos de 1 mL da solução contendo padrão de benznidazol a 20 µg/mL em 80% v/v de tampão acetato pH 4,0 e 20% v/v de acetonitrila. A etapa de lavagem (*clean-up*) foi realizada com 1 mL de tampão acetato e dessorção com 1 mL de acetonitrila.

5.4 Validação do método bioanalítico para determinação de benznidazol em plasma humano

Após a otimização das etapas de precipitação de proteínas e da extração por MEPS, procedeu-se à validação de método bioanalítico, conforme a RDC 27/2012 da ANVISA. Foram validados os seguintes parâmetros: seletividade, efeito residual, efeito matriz, curva de calibração, precisão, exatidão e estabilidade.

Para a realização da validação do método bioanalítico, definiu-se as condições apresentadas na **Tabela 9**.

Tabela 9 – Condições para a validação do método bioanalítico para análise de benznidazol em plasma humano.

Condição	Concentração (µg/mL)
Faixa de trabalho	0,5 – 6,0
Limite Inferior de Quantificação (LIQ)	0,5
Limite Superior de Quantificação (LSQ)	6,0
Controle de Qualidade Baixo (CQB)	1,0
Controle de Qualidade Médio (CQM)	3,0
Controle de Qualidade Alto (CQA)	5,0
Controle de Qualidade de Diluição (CQD)	8,0
Padrão Interno (PI)	3,0

5.4.1 Seletividade

A seletividade do método bioanalítico foi avaliada em 4 amostras de plasma branco, de indivíduos diferentes; uma amostra de plasma lipêmico; uma amostra de plasma hemolisado; e em amostras de plasma branco fortificadas com padrões de cafeína, nicotina e paracetamol, substâncias comumente encontradas nos indivíduos. De acordo com a RDC 27/2012, as respostas de picos interferentes próximo ao tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras do LIQ, enquanto as respostas de picos interferentes próximo ao tempo de retenção do PI devem ser inferiores a 5 % da resposta do PI.

Todas as amostras foram submetidas à precipitação de proteínas e extração por MEPS e injeção no sistema cromatográfico. As soluções de cafeína, nicotina e paracetamol foram preparadas de forma a obter as concentrações plasmáticas usuais destas substâncias, como descrito por César (2009), sendo elas: 1 µg/mL de cafeína e 20 µg/mL de paracetamol. A concentração plasmática da nicotina foi baseada no trabalho de Rosemberg (2003), sendo ela de 10 ng/mL.

As soluções preparadas estão descritas a seguir.

Solução Estoque de Cafeína SQR 500 µg/mL: pesaram-se exatamente cerca de 5 mg de cafeína SQR e transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com metanol grau cromatográfico e homogeneizou-se. Submeteu-se ao aparelho de ultrassom por 10 minutos.

Solução de Trabalho de Cafeína SQR 2 µg/mL: pipetaram-se 40 µL da solução estoque de cafeína e transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se 1 mL de metanol (10%), completou-se o balão com água ultrapurificada e homogeneizou-se.

Solução Estoque de Nicotina SQR 500 µg/mL: pipetaram-se 25 µL de nicotina SQR e transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 50 mL. Completou-se o volume com metanol grau cromatográfico e homogeneizou-se. Submeteu-se ao aparelho de ultrassom por 10 minutos.

Solução Intermediária de Nicotina SQR 10 µg/mL: pipetaram-se 200 µL da solução estoque de nicotina e transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 10 mL. Adicionaram-se 2 mL de metanol grau cromatográfico (20% v/v), completou-se com água ultrapurificada e homogeneizou-se. Submeteu-se ao aparelho de ultrassom por 10 minutos.

Solução de Trabalho de Nicotina SQR 0,2 µg/mL: pipetaram-se 200 µL da solução intermediária de nicotina e transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se 1 mL de metanol grau cromatográfico (10% v/v), completou-se com água ultrapurificada e homogeneizou-se.

Solução de Trabalho de Paracetamol SQR 400 µg/mL: pesaram-se exatamente cerca de 4 mg de paracetamol SQR e transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se 1 mL de metanol grau cromatográfico (10% v/v), completou-se com água ultrapurificada e homogeneizou-se. Submeteu-se ao aparelho de ultrassom por 10 minutos.

A redução da proporção de metanol como diluente nas soluções acima descritas se deve à diminuição de solvente orgânico para o preparo de amostra, de forma a evitar a competição da fase móvel com a fase estacionária,

favorecendo a retenção do analito. Entretanto, uma pequena quantidade foi mantida a fim de garantir a completa solubilização dos analitos.

5.4.2 Efeito Residual

O efeito residual, ou *carry-over*, foi avaliado por meio da injeção de uma mesma amostra branco, sendo uma injeção feita antes da amostra no Limite Superior de Quantificação (LSQ), definido em 6,0 µg/mL, e duas injeções após esta mesma amostra.

Segundo a RDC 27/2012, as respostas de picos interferentes no tempo de retenção do analito devem ser menores que 20% da resposta do analito no LIQ e as respostas de picos interferentes no tempo de retenção do padrão interno devem ser menores que 5% da resposta do PI.

5.4.3 Efeito Matriz

Para avaliação do efeito matriz, foram preparadas quatro amostras branco, duas amostras lipêmicas e duas amostras hemolisadas. Ao término da etapa de preparo de amostra, as soluções contendo uma quantidade conhecida de padrão de benznidazol e benzocaína foram adicionadas a estas amostras. As concentrações do analito e do padrão interno, segundo a RDC 27/2012, devem ser as mesmas do Controle de Qualidade Baixo (1,0 µg/mL) e do Controle de Qualidade Alto (5,0 µg/mL).

Na RDC 27/2012 é preconizado que o desvio padrão relativo do Fator de Matriz Normalizado (FMN), calculado pela equação abaixo, de todas as amostras deve ser inferior a 15%.

$$FMN = \frac{\text{Área do analito na matriz} / \text{Área do padrão interno na matriz}}{\text{Área do analito em solução} / \text{Área do padrão interno em solução}}$$

5.4.4 Curva de Calibração

Foram realizadas três curvas de calibração para avaliação da linearidade, contendo seis amostras em diferentes níveis, sendo a faixa de concentração analisada de 0,5 µg/mL a 6,0 µg/mL. Esta faixa compreende as concentrações plasmáticas de benznidazol encontradas por Altcheh *et al.* (2014) e Marsón *et al.* (2013). Também foram analisadas amostras branco e amostras zero, em triplicata, conforme preconizado pela RDC 27/2012 da ANVISA. A amostra branco é definida pela RDC 27/2012 como “amostra de matriz processada sem adição de analito e padrão interno”, enquanto a amostra zero é definida como uma “amostra de matriz processada com adição apenas de padrão interno (PI)”.

As curvas foram preparadas fortificando-se as amostras de plasma branco com as concentrações de benznidazol nos níveis 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 e 6,0 µg/mL e o PI na concentração de 3,0 µg/mL. Todas as amostras foram submetidas aos processos de precipitação e extração por MEPS antes da análise por HPLC, configurando três curvas matrizadas, como preconizado pela RDC 27/2012 da ANVISA.

Os padrões de calibração estariam aprovados se apresentassem desvios menores que 15% em relação à concentração nominal, exceto para o LIQ, no qual se admite desvios de até 20%. A curva estaria aprovada se 75% dos níveis estivessem aprovados, conforme os desvios especificados, contendo pelo menos seis níveis, incluindo o LIQ e LSQ.

5.4.5 Precisão e Exatidão

A precisão foi determinada como precisão intracorrida e intercorridas. A precisão intracorrida compreendeu a análise de três replicatas autênticas nas concentrações do LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD, sendo realizada em um mesmo dia. Já a precisão intercorridas compreendeu a análise de três replicatas das mesmas concentrações analisadas na precisão intracorrida, mas em três dias distintos. Considerando que o tempo gasto para análise de uma amostra é, em

média, 45 minutos (incluindo a lavagem entre amostras), optou-se pela realização da precisão em triplicata ao invés de quintuplicata.

A exatidão foi avaliada em exatidão intracorrída e intercorrídas, assim como na precisão. A exatidão intracorrída foi determinada nas concentrações do LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD, em triplicata autêntica e em uma mesma corrída, enquanto a exatidão intercorrídas foi determinada nas mesmas concentrações, mas analisando-se em três dias distintos.

O CQD foi preparado fortificando-se uma amostra de 450 µL de plasma branco com 50 µL de uma solução de benznidazol e PI nas concentrações de 160 µg/mL e 60 µg/mL, respectivamente. Foram adicionados 500 µL de TCA 10% p/v para precipitação das proteínas, obtendo-se as concentrações de 8 µg/mL para o benznidazol e 3 µg/mL para o PI. Procedeu-se à centrifugação e posterior extração por MEPS. Ao eluato obtido na etapa de dessorção, constituído de 150 µL de acetonitrila (3 x de 50 µL), foram adicionados mais 150 µL de acetonitrila e 450 µL de água ultrapurificada para diluição na proporção da fase móvel utilizada.

A precisão foi demonstrada por meio dos cálculos dos DPRs, enquanto a exatidão foi demonstrada por meio do Erro Padrão Relativo (EPR) entre os valores obtidos experimentalmente e os valores nominais da concentração, conforme equação abaixo:

$$EPR = \frac{(Concentração\ Média\ Determinada - Concentração\ Nominal) \times 100}{Concentração\ Nominal}$$

Segundo a RDC 27/2012, a precisão do método é demonstrada quando não se observa DPRs acima de 15%, exceto para o LIQ, no qual se admite um desvio de até 20%. Para a exatidão, o EPR de cada amostra não deve ser superior a 15%, exceto para o LIQ, que se admite erro de até 20%.

5.4.6 Estabilidade do analito e PI em solução

Por fim, a estabilidade do analito e padrão interno em solução foi realizada em triplicata, nas soluções estoque e nas soluções de trabalho, sendo as concentrações para o benznidazol iguais às do CQB e CQA e do padrão interno, de 3,0 µg/mL. As soluções foram injetadas logo após o preparo e, após um dia para as soluções de benznidazol, e após três dias para a solução do padrão interno.

As soluções são consideradas estáveis se não apresentarem desvio superior a 10% em relação às soluções recém-preparadas, de acordo com a RDC 27/2012.

5.4.7 Estabilidade do benznidazol em matriz biológica

Para avaliação da estabilidade da matriz biológica, foram analisadas três amostras CQB e três amostras CQA logo após o preparo de amostras para fins de comparação com os testes de estabilidade realizados.

A estabilidade das amostras após ciclos de congelamento e descongelamento foi realizada de duas formas. Primeiramente, fortificaram-se 450 µL de plasma com 50 µL da solução padrão contendo benznidazol nas concentrações do CQB (1,0 µg/mL) e do CQA (5,0 µg/mL) e padrão interno. Submeteu-se ao vórtex por 2 minutos. Precipitou-se as proteínas com a adição de 500 µL de ácido tricloroacético 10% p/v. Centrifugou-se a 845 x g, a 4 °C, por 10 minutos. As amostras foram então submetidas a congelamento em ultrafreezer, a -50 °C e descongeladas após 24h. Procedeu-se, então, ao preparo de amostra por MEPS e análise por CLAE. Paralelamente, analisou-se a estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento das amostras fortificadas somente com benznidazol, simulando o congelamento e descongelamento de amostras reais. Para tanto, fortificaram-se 450 µL de plasma com 50 µL da solução padrão contendo benznidazol nas concentrações do CQB (1,0 µg/mL) e do CQA (5,0 µg/mL) e submeteu-se ao vórtex por 2

minutos. As amostras foram então submetidas à congelamento em ultrafreezer, a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ e descongeladas após 24h. Após completo descongelamento, congelou-se as amostras novamente e descongeladas após 24h, repetindo-se o ciclo por mais duas vezes. Adicionou-se então o padrão interno e submeteu-se ao vórtex novamente por 2 minutos. Adicionaram-se $500\text{ }\mu\text{L}$ de ácido tricloroacético 10% p/v. Centrifugou-se a 845 x g , a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 10 minutos. Procedeu-se, então, à extração por MEPS e análise por CLAE.

Para análise de estabilidade de curta duração, fortificaram-se as amostras de plasma branco, conforme o procedimento otimizado, nas concentrações CQB e CQA, em triplicata. As amostras foram então deixadas à temperatura ambiente por 12 horas. Procedeu-se então à precipitação de proteínas com ácido tricloroacético e posterior centrifugação. Em seguida, realizou-se a extração por MEPS e análise por CLAE.

Para análise de estabilidade de longa duração, fortificaram-se as amostras de plasma branco, conforme o procedimento otimizado, nas concentrações CQB e CQA, em triplicata. As amostras foram submetidas à precipitação de proteínas com ácido tricloroacético e posterior centrifugação. Após a centrifugação, as amostras foram congeladas em ultrafreezer, a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 10 dias. Procedeu-se, então, à extração por MEPS e análise por CLAE.

A análise de estabilidade pós-processamento foi realizada de maneira similar à análise de estabilidade de curta duração, porém considerando-se o tempo gasto para o preparo de amostra e a última análise. Desta forma, as amostras de plasma branco foram fortificadas com a solução padrão de benznidazol nas concentrações de CQB e CQA, adicionadas de padrão interno, em triplicata. As amostras foram então deixadas à temperatura ambiente por 20 horas. Procedeu-se então à precipitação de proteínas com ácido tricloroacético e posterior centrifugação. Em seguida, realizou-se a extração por MEPS e análise por CLAE.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Desenvolvimento de método analítico por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência

O método cromatográfico, aqui denominado método analítico, foi desenvolvido e validado a fim de realizar os testes iniciais de extração com solução de benznidazol em solvente. Foram realizados testes empregando MEPS e SPE convencional com este método.

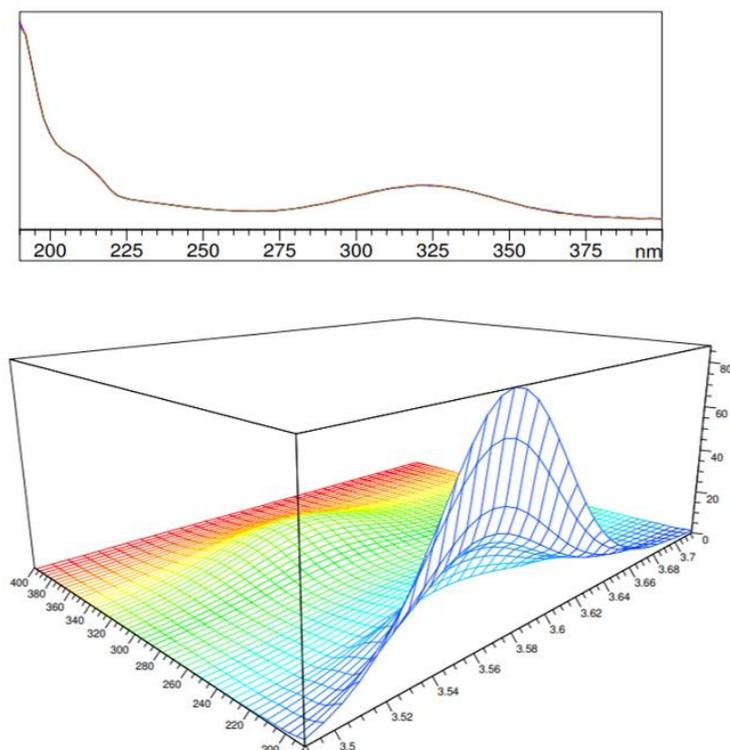
Silva *et al.* (2007) desenvolveram método para determinação de benznidazol empregando as condições descritas na **Tabela 10**. Estas condições foram inicialmente empregadas para análise benznidazol e, posteriormente, otimizadas.

Tabela 10 – Condições cromatográficas iniciais para desenvolvimento de método analítico

Condições cromatográficas	
Coluna	Luna C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm)
Fase Móvel	Água: Acetonitrila
Proporção de Fase Móvel	50:50
Vazão de Fluxo	1,0 mL/min
Volume de Injeção	20 µL
Temperatura do forno	25 °C
Detecção	316 nm

O comprimento de onda utilizado é justificado pelo espectro da região ultravioleta do benznidazol representado na **Figura 15**.

Figura 15 – Espectro 2D e 3D na região ultravioleta do benznidazol.



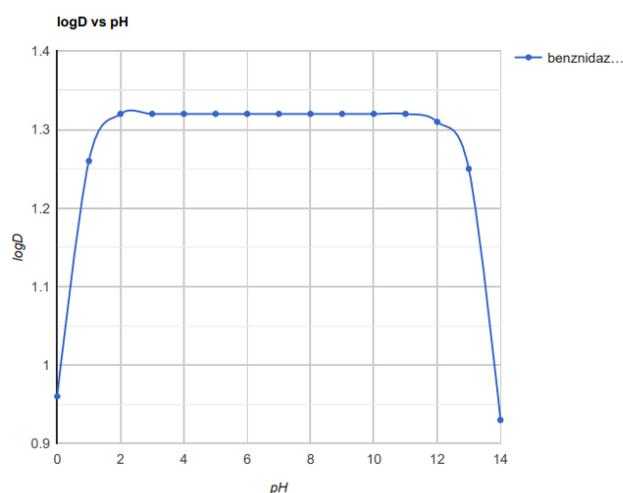
Apesar de o máximo de absorção do benznidazol ocorrer em torno de 220 nm, a maioria das moléculas também apresenta absorção próxima a esse comprimento de onda, devido às ligações do tipo $n \rightarrow \sigma^*$. Dessa forma, escolheu-se o máximo de absorção em 316 nm, região mais seletiva.

O volume de injeção é explicado pelas dimensões da coluna, considerando sua área transversal e sua largura. Para colunas com 4,6 mm de diâmetro interno, como é o caso da coluna utilizada, e comprimento variando entre 50 e 250 mm (sendo o comprimento da coluna utilizada de 150 mm), o volume ideal de injeção para obtenção de picos simétricos é de 8 a 40 μL , sendo 20 μL o mais comumente utilizado.

Como o estudo realizado por Silva *et al.* (2007) demonstrou que a temperatura não influenciou o formato dos picos, o forno foi mantido à temperatura ambiente.

Buscando a otimização da análise cromatográfica, assim como da etapa de preparo de amostra, avaliou-se a necessidade do uso de solução tampão, de forma a aumentar o fator de capacidade e a extração do analito. Uma vez que tanto a análise cromatográfica quanto o preparo de amostra foram realizados em fase reversa, objetivou-se um pH no qual $\log P$ do analito fosse mais alto. Na **Figura 16** é apresentado o gráfico de correlação entre o $\log D$ do benznidazol e o pH.

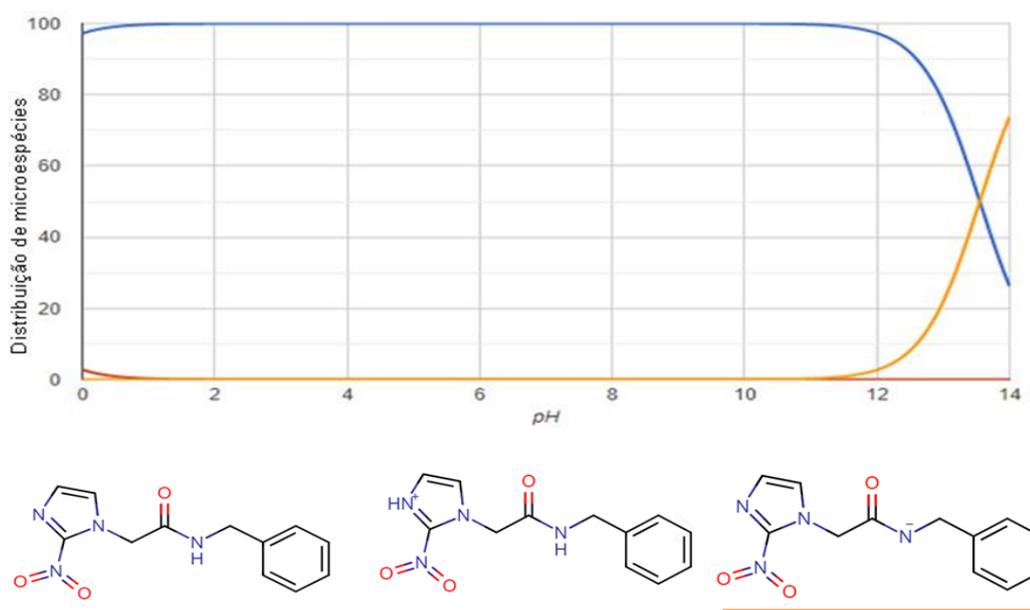
Figura 16 – Gráfico $\log D$ versus pH para Benznidazol.



Fonte: ChemAxon (acesso em 09 de novembro de 2020).

Pode-se inferir, a partir da **Figura 16**, que o benznidazol apresenta valor máximo de $\log P$ na faixa de pH entre 2 e 12. A distribuição das diferentes espécies de benznidazol (ionizadas e não-ionizadas) estão apresentadas na **Figura 17**. Como pode ser visto, 100% das moléculas de benznidazol estão não ionizadas na faixa de pH entre 2,0 e 12,0. A espécie ionizada em pH abaixo de 2 apresenta o nitrogênio do anel imidazólico protonado, enquanto a espécie ionizada em pH acima de 12 apresenta o nitrogênio do grupo amida desprotonado.

Figura 17 – Distribuição das espécies ionizadas e não-ionizada do Benznidazol.



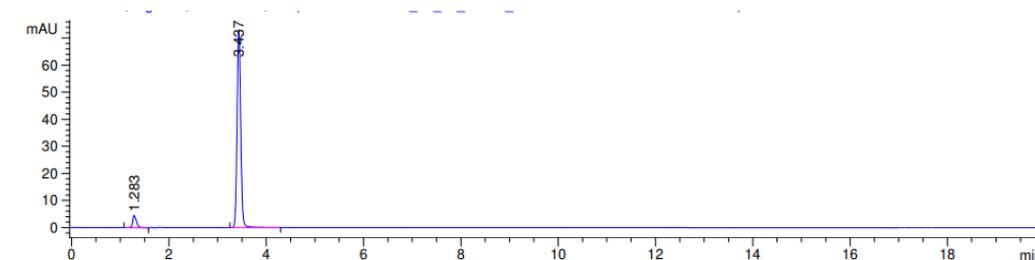
Fonte: ChemAxon (acesso em 09 de novembro de 2020).

A fim de evitar grandes variações de pH e preservar a coluna cromatográfica, testou-se o uso de tampão acetato de sódio, 0,01 mol/L, pH 4,0. Foi então preparada uma solução padrão de benznidazol a 20 µg/mL, em 80% v/v de tampão acetato e 20% v/v de acetonitrila, para avaliação do método cromatográfico. O cromatograma apresentou pico simétrico, sendo o tempo de retenção do benznidazol igual a 4,189 min e uma área média de 375,17. Contudo, após a realização do preparo de amostra, com e sem utilização do tampão, os picos se apresentaram assimétricos e com uma maior variação de área. Destarte, procedeu-se ao ajuste da fase móvel de forma a obter picos mais simétricos.

Foram realizados testes utilizando-se metanol como co-solvente, a fim de melhorar o fator de cauda, em diversas proporções, mas este fator ainda se apresentou maior que o obtido utilizando somente água e acetonitrila como fase móvel. Assim, utilizou-se água ao invés de tampão, com ajuste para a proporção de 60% de água e 40% de acetonitrila demonstrou-se satisfatório, com área

média para o benznidazol de 379,99. O cromatograma obtido nessas condições está apresentado na **Figura 18**.

Figura 18 – Cromatograma obtido após otimização do método cromatográfico.



O cromatograma apresenta um tempo de retenção adequado para o analito de interesse, sendo de 3,44 min, após o tempo morto. O volume morto da coluna foi estimado através das equações abaixo:

$$V_m \approx 0,5Ld^2 \quad (\text{Equação 1})$$

$$t_0 = \frac{v_m}{F} \quad (\text{Equação 2})$$

onde,

v_m = volume morto, em mL;

L = comprimento da coluna, em cm;

D = diâmetro da coluna, em cm;

t_0 = tempo morto, em min;

F = vazão, em mL/min.

Considerando as dimensões da coluna e a vazão igual a 1,0 mL/min, tem-se que o tempo morto da coluna é estimado em 1,587 min. Entretanto, é possível observar no cromatograma da **Figura 18**, que o primeiro pico ocorre em 1,283, sendo este, portanto, o tempo utilizado como tempo morto real.

Dadas essas informações, obteve-se então o fator de capacidade, também chamado fator de retenção k . Este fator impacta diretamente na

resolução dos picos, uma vez que quanto maior a retenção do analito, maior sua interação com a fase estacionária e, portanto, melhor separação. Entretanto, uma retenção demasiada pode gerar um alargamento de pico, que pode acarretar em diferenças na área e comprometimento da resolução. Destarte, Snyder *et al.* (1997), propõe que o fator de capacidade k ideal, para analitos simples, esteja entre 1 e 20. O cálculo deste fator é realizado por meio da equação abaixo:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (\text{Equação 3})$$

onde,

t_R = tempo de retenção do analito,

t_0 = tempo morto.

Assim, considerando o tempo morto igual a 1,283 min (obtido experimentalmente) e o tempo de retenção do analito igual a 3,437 min, obtém-se um fator de capacidade igual a 1,68.

A altura e área do pico demonstram detectabilidade satisfatória do método. A simetria igual a 0,89 também está de acordo com o preconizado por Snyder *et al.* (1997), na qual a proximidade de uma unidade indica perfeita simetria. Os números de pratos teóricos (N) apontam a eficiência de separação, indicando uma boa separação de possíveis interferentes, além de indicar a qualidade e performance da coluna. Snyder *et al.* (1997) definem o número de pratos teóricos como “a habilidade da coluna de produzir picos finos e estreitos para obter uma boa resolução de pares de picos com valores de seletividade baixos”. O número de pratos teóricos pode ser calculado segundo a equação abaixo:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (\text{Equação 4})$$

em que,

N = número de pratos teóricos;

t_R = tempo de retenção;

W = largura do pico.

O número de pratos teórico calculado pelo *software* ChemStation do próprio cromatógrafo é igual a 11462, o que indica ótima eficiência de separação, segundo os critérios estabelecidos por Snyder *et al.* (1997), nos quais uma coluna com comprimento de 150 mm e diâmetro de partícula igual a 5 μm , os valores ótimos de números de pratos teóricos seriam entre 10000 – 12000. Os parâmetros cromatográficos obtidos estão na **Tabela 11**.

Tabela 11 – Parâmetros cromatográficos obtidos após a otimização do método analítico.

Parâmetros cromatográficos	
Tempo de retenção	3,437 min
Área do pico	378,41
Altura do pico	72,95 mAu
Fator de capacidade	1,30
Simetria	0,89
Largura	0,0756
Número de pratos teóricos	11462

O método analítico desenvolvido foi empregado nos procedimentos iniciais da extração de benznidazol em solução por MEPS e SPE convencional.

Uma vez definidas as condições cromatográficas, procedeu-se à validação do método, de acordo com a RDC 166/2017 da ANVISA e o trabalho de Souza (2007).

6.2 Validação de método analítico por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência para análise de benznidazol

Foram validados os parâmetros de linearidade, precisão intradia (repetibilidade) e precisão intermediária (interdias), exatidão, limites de detecção e quantificação e robustez.

6.2.1 Linearidade

A linearidade foi avaliada na faixa de 1 a 50 $\mu\text{g/mL}$, em triplicata, conforme preconizado pela RDC 166/2017 da ANVISA. A faixa de trabalho escolhida compreende a concentração plasmática média de benznidazol relatada por Marsón *et al.* (2013), de 3 a 6 $\mu\text{g/mL}$ em plasma de pacientes adultos, e nos estudos de Altcheh *et al.* (2014), cuja concentração plasmática média encontrada para pacientes adultos foi de 5,81 $\mu\text{g/mL}$ e de 4,53 $\mu\text{g/mL}$ para crianças. O limite superior da curva em 50 $\mu\text{g/mL}$ deve-se à análise de benznidazol empregando SPE convencional, cuja solução de benznidazol empregada foi de 20 $\mu\text{g/mL}$, utilizada para fins de comparação com a extração realizada por MEPS.

O gráfico de dispersão da concentração versus área sob a curva dos resultados está apresentado na **Figura 19**. Os resíduos estão apresentados na **Figura 20**.

Figura 19 – Gráfico de dispersão concentração de benznidazol versus área sob a curva obtidos na avaliação da linearidade do método analítico.

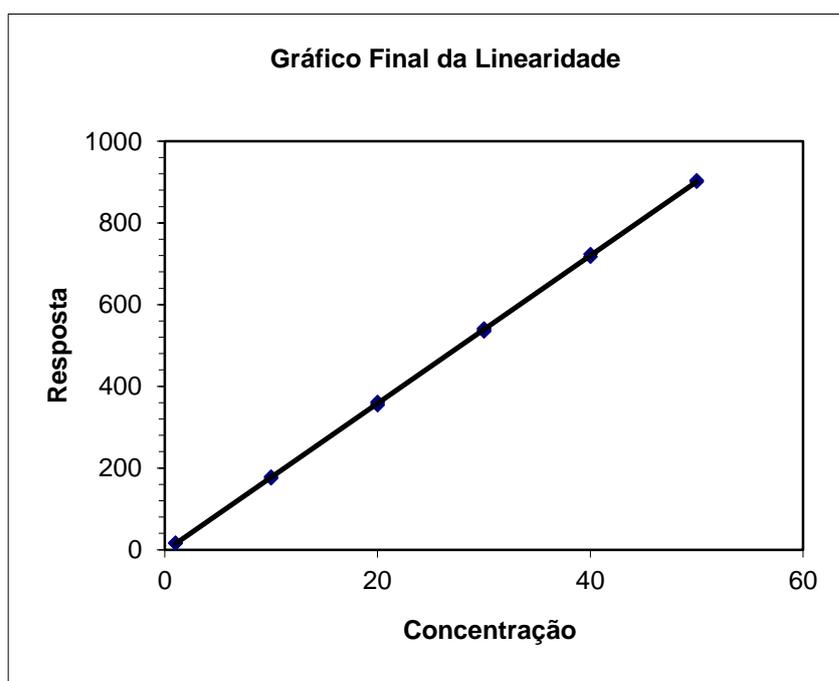
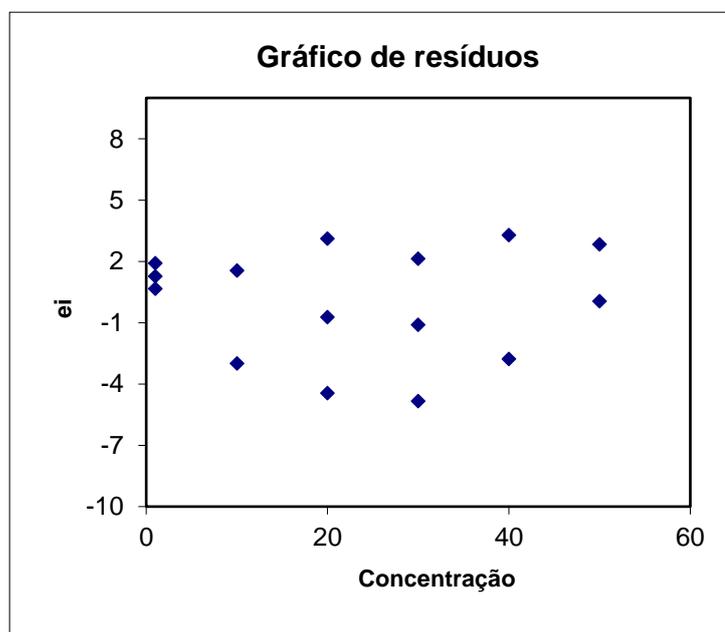


Figura 20 – Gráfico de dispersão dos resíduos obtidos na avaliação da linearidade do método analítico.



A significância do modelo linear e a falta de ajuste do modelo foi calculada pela Análise de Variância (ANOVA) e os parâmetros estão descritos na **Tabela 12**.

Tabela 12 – Parâmetros obtidos pela Análise de Variância (ANOVA) na determinação da linearidade.

Parâmetros de Regressão Linear	
Coeficiente de Determinação (r^2)	0,99992
Números de pontos (n)	15
Coeficiente angular \pm desvio padrão	18,08 \pm 0,04449
Coeficiente linear \pm desvio padrão	-3,45 \pm 1,2741
F de regressão calculado	165177,54
F de regressão tabelado	4,67
F de falta de ajuste calculado	0,43
F de falta de ajuste tabelado	3,63

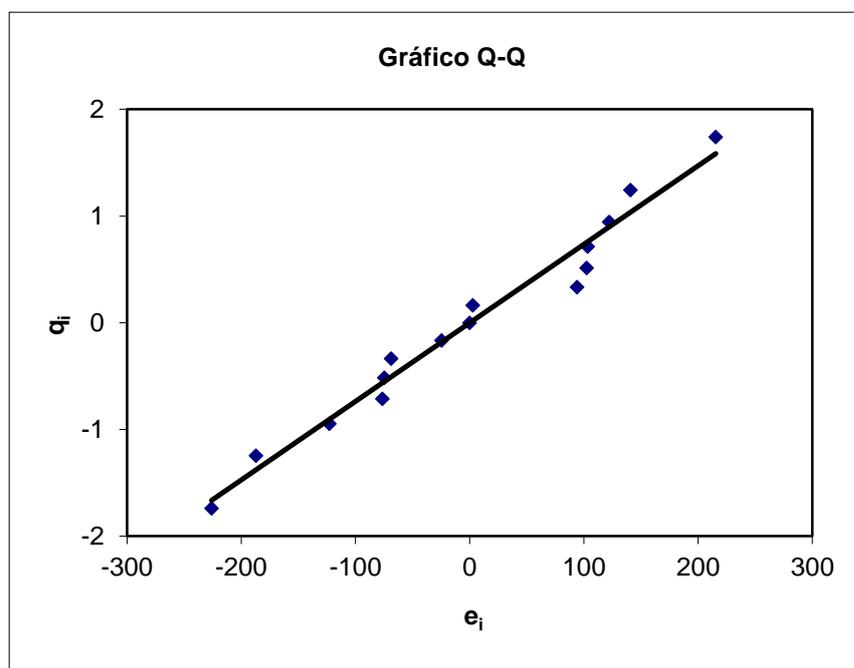
O coeficiente de determinação (r^2) foi maior que 0,99, valor mínimo preconizado pela RDC 166/2017, indicando que 99,992% dos dados obtidos são explicados pelo modelo linear proposto. A equação da reta obtida pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinários, que minimiza a soma dos quadrados dos resíduos da regressão foi $y = 18,08069x - 3,4473$.

A partir dos dados apresentados na **Tabela 12**, verificamos que o F de significância da regressão é maior que o F tabelado, concluindo-se que a regressão do modelo é significativa. De maneira similar, o F de significância da falta de ajuste do modelo foi menor que o F tabelado, indicando que não há falta de ajuste.

Os resultados de área em relação à concentração foram submetidos à avaliação de presença de valores extremos, ou *outliers*, pelo método dos resíduos padronizados de Jackknife. Segundo este método, podem ser retirados até 22% de resultados *outliers*. Uma vez que a curva analítica analisada contém seis pontos, em triplicata, o n inicial foi igual a 18, permitindo então a retirada de até quatro *outliers*, desde que não se retirasse todas as replicatas de um nível. Foram encontrados três *outliers* que foram devidamente retirados e o método dos mínimos quadrados ordinários reavaliado após a exclusão destes dados.

Em seguida, foi realizado o teste de Ryan-Joiner para avaliação da normalidade dos resíduos. A hipótese nula (H_0), em que os resíduos seguem a normalidade, é testada contra a hipótese alternativa (H_a), em que os resíduos seguem outra distribuição de probabilidade. Os resíduos são então avaliados pelo gráfico de probabilidade normal (gráfico quantil-quantil – QQ) e pelo coeficiente de correlação de Ryan-Joiner. Na **Figura 21**, encontra-se o gráfico QQ obtido na avaliação da linearidade.

Figura 21 – Gráfico Q-Q para avaliação da normalidade dos resíduos.

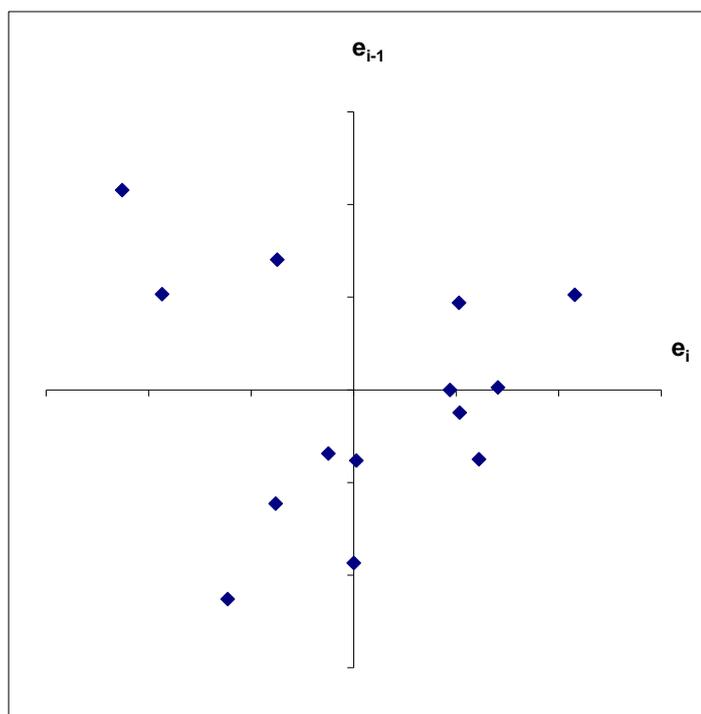


A distribuição dos resíduos em uma linha reta indica que os resíduos seguem a normalidade, o que é confirmado pelo cálculo do coeficiente de Ryan-Joiner igual a 0,9860, com nível de significância $p > 0,10$. Dessa forma, aceita-se a hipótese nula e rejeita-se a hipótese alternativa, isto é, aceita-se a hipótese de que os resíduos seguem a normalidade.

Em seguida, foi avaliada a independência dos resíduos pelo teste de Durbin-Watson, cuja hipótese nula (H_0) afirma que os resíduos são independentes entre si e a hipótese alternativa (H_a) afirma que há correlação (dependência) entre os resíduos. Este teste avalia o conjunto de dados entre os limites inferior (d_L) e superior (d_U). Sendo os valores de d_L e d_U calculados para nível de significância $\alpha = 0,05$ iguais a 1,08 e 2,92, respectivamente, e o valor do coeficiente de correlação d calculado a partir dos dados obtidos igual a 2,001, conclui-se que não há correlação entre os resíduos. Desta forma, aceita-se a hipótese nula e rejeita-se a hipótese alternativa. Portanto, os resíduos são independentes entre si. A independência também é observada pelo gráfico de Durbin-Watson, apresentado na **Figura 22**, uma vez que os resíduos observados

versus os resíduos imediatamente anteriores se apresentam aleatórios entre os quatro quadrantes.

Figura 22 – Gráfico de Durbin-Watson para avaliação da independência dos resíduos.



Foi avaliada então a homoscedasticidade dos resíduos pelo teste de Brown-Forsythe ou Levene modificado, cuja hipótese nula (H_0) afirma que as variâncias entre os resíduos não divergem, ou seja, há homoscedasticidade, e a hipótese alternativa (H_a) afirma que as variâncias são diferentes e, portanto, há heteroscedasticidade. Este teste propõe a divisão dos dados em dois grupos iguais ou com n parecidos e então calcula-se a mediana dos dois grupos. É então calculada a média da diferença entre os resíduos e a mediana e a soma dos quadrados dos desvios, obtendo o t_L que é comparado com o valor de t crítico tabelado. O t_L calculado foi igual a 0,816 com significância p igual a 0,4295, sendo menor que 0,5. Assim, aceita-se a hipótese nula de que as variâncias dos resíduos não divergem entre si, ou seja, há homoscedasticidade.

Conclui-se, portanto, que o modelo proposto apresenta regressão significativa e que não há falta de ajuste no modelo linear.

6.2.2 Precisão

A análise de precisão em condições de repetitividade e precisão intermediária foi demonstrada por meio cálculo do desvio padrão relativo obtido das seis replicatas nos níveis baixo, médio e alto. Os dados estão apresentados na **Tabela 13**.

Tabela 13 – Teor e Desvio Padrão Relativo das amostras analisadas na precisão.

Nível de Concentração	Replicata	Teor (%)	DPR _r	DPR _R
1,0 µg/mL	1	101,19	1,82%	2,38%
	2	105,36		
	3	102,38		
	4	101,80		
	5	100,28		
	6	98,83		
25,0 µg/mL	1	97,89	0,68%	1,29%
	2	98,55		
	3	99,70		
	4	100,28		
	5	100,67		
	6	100,13		
50,0 µg/mL	1	98,59	4,09%	4,09%
	2	109,13		
	3	100,52		
	4	99,97		
	5	100,60		
	6	103,43		

Legenda: DPR_r – Desvio Padrão Relativo da repetibilidade; DPR_R – Desvio Padrão Relativo da Precisão Intermediária.

Os três níveis analisados apresentaram precisão adequada, uma vez que os Desvios Padrão Relativos foram menores que 5%, em ambas as condições de repetibilidade e precisão intermediária. Os valores apresentados foram

comparados pelo teste de Tukey, não apresentando diferença significativa para $p > 0,05$.

6.2.3 Exatidão

Para avaliação da exatidão, foram determinados os valores de recuperação obtidos simultaneamente à análise de precisão. O nível baixo apresentou uma recuperação igual a 101,6%, o nível médio, 99,5%, e o nível alto, 102,0%, demonstrando a exatidão do método.

6.2.4 Limites de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados pela equação da reta, sendo o LD igual a 0,211 $\mu\text{g/mL}$ e o LQ igual a 0,705 $\mu\text{g/mL}$.

6.2.5 Robustez

As condições testadas nos ensaios de robustez foram comparadas com a área e o tempo de retenção (t_R) do analito obtidos no método analítico otimizado. As respostas para cada condição estão descritas na **Tabela 14**, assim como o Desvio Padrão Relativo (DPR) em relação aos valores de área do método otimizado.

Tabela 14 – Respostas de área e tempo de retenção obtidas no ensaio de robustez do método analítico.

Condição	Varição	t _R	Área	DPR
Proporção Água:ACN na fase móvel	62:38	3,493	352,0	4,51%
	58:42	3,037	352,8	4,35%
Temperatura	20 °C	3,442	353,1	4,29%
	35 °C	3,281	351,9	4,53%
Vazão da fase móvel	0,9 mL/min	3,598	393,6	3,39%
	1,1 mL/min	2,997	318,0	11,66%

A partir dos dados apresentados na **Tabela 14**, observa-se que todas as condições apresentam desvios padrão relativos abaixo de 5%, exceto a vazão de 1,1 mL/min. Portanto, pode-se inferir que o método é robusto frente a variações de temperatura, proporção de fase móvel e vazões de fase móvel menores, mas deve-se ter cuidado em vazões ligeiramente maiores que 1,0 mL/min.

6.3 Desenvolvimento de método bioanalítico por MEPS-CLAE-UV para a análise de benznidazol em plasma humano

O método cromatográfico empregando na análise de amostras de plasma foi muito similar ao método analítico desenvolvido e validado, apresentado nas seções anteriores. Entretanto, foi necessário otimizar o volume de injeção, passando de 20 para 40 µL, a fim de aumentar a detectabilidade do método.

Considerando-se as especificações de Snyder *et al* (1997) para a seleção de padrão interno, assim como os padrões internos utilizados em métodos bioanalíticos para análise de benznidazol descritos na literatura (DAVANÇO, 2015; GUERRERO *et al.*, 2011; PINAZO *et al.*, 2013), optou-se pela utilização do fármaco anestésico benzocaína como padrão interno.

Em relação à etapa de extração, inicialmente foram realizados os testes empregando a técnica MEPS para análise de benznidazol em solução aquosa, com adição do padrão interno benzocaína, para verificação da capacidade de extração.

As condições utilizadas nessa etapa foram as seguintes: condicionamento do cartucho contendo fase C18 com 250 µL de metanol, seguidos de 250 µL de água ultrapurificada e aplicação de solução contendo benznidazol e benzocaína, ambos na concentração de 20 µg/mL. Na sequência, foram feitos 5 ciclos de aspiração e ejeção de 100 µL, lavagem com 4 vezes de 100 µL de água ultrapurificada e eluição com 3 vezes de 50 µL de acetonitrila. Para lavagem do cartucho depois de cada amostra, foram realizadas 4 aspirações de 100 µL de acetonitrila e posterior ejeção, seguidos de 4 aspirações e ejeção de 100 µL de água ultrapurificada. A escolha de acetonitrila para a eluição de benznidazol foi feita considerando-se a adequada solubilidade do fármaco neste solvente. Da mesma forma, o uso de acetonitrila na lavagem é justificado pela solubilidade do fármaco e padrão interno, evitando-se *carry-over*.

Contudo, observou-se o efeito residual em análise de amostras subsequentes. A fim de eliminar este efeito, a etapa de lavagem após cada amostra foi otimizada para 4 ciclos de 250 µL (volume máximo da seringa de MEPS utilizada) de acetonitrila, seguida de 4 ciclos de 250 µL de água ultrapurificada, conforme proposto por Said *et al.* (2012). A otimização da lavagem mostrou-se efetiva para eliminação do *carry-over*.

A fim de diminuir a perda de benznidazol na etapa de lavagem (*clean-up*) anterior à dessorção, reduziu-se a lavagem para dois ciclos de aspiração e ejeção de água ultrapurificada, o que resultou em uma diminuição média de 6% de perda para uma média de 3%.

Foram testados os sorventes C2, C8, C18 e modo misto M1 de troca iônica, para determinação da fase extratora que apresentaria maior recuperação. As recuperações obtidas estão descritas na **Tabela 15**.

Tabela 15 – Resultados de recuperação de benznidazol para diferentes sorventes em MEPS.

Sorvente	Recuperação de Benznidazol (%)	Recuperação de Benzocaína (%)	DPR (n=3)
C2	0,94	1,05	19,66%
C8	7,34	10,42	1,81%
C18	11,04	18,58	7,20%
M1	7,47	9,63	2,38%

Conclui-se, a partir dos dados da **Tabela 15**, que a fase extratora C18 apresenta maior recuperação para o analito de interesse, assim como para o padrão interno. Uma vez que as fases mais polares, C2 e M1, não apresentaram boa recuperação, não se realizou testes em cartucho de sílica pura. O cartucho comercial C18 foi escolhido como sorvente e submetido à otimização.

Considerando-se a dimensão do cartucho, assim como a quantidade reduzida de material extrator, optou-se por realizar previamente a etapa de precipitação de proteínas. Além de evitar entupimentos e, conseqüentemente, a deterioração do cartucho e redução do seu tempo de vida útil, a precipitação deixa as moléculas do fármaco mais disponíveis para serem extraídas, já que causa rompimento da ligação fármaco-proteína. Esta etapa foi avaliada e otimizada utilizando-se os agentes precipitantes ácido tricloroacético, nas concentrações de 30% p/v e 10% p/v em água; ácido tricloroacético na concentração de 10% p/v, em acetonitrila; e acetonitrila. Segundo o estudo de Polson *et al.* (2003), o ácido tricloroacético apresenta melhores recuperações em plasma humano na proporção 1:1, seguida de 1,5:1, 0,5:1 e 2:1. Já a acetonitrila apresenta maiores recuperações na proporção 4:1. Entretanto, esta proporção causaria uma grande diluição da amostra e preferiu-se avaliar as proporções de 1:1, 2:1 e 2,5:1, que obtiveram recuperações acima de 88% nos testes feitos por aqueles autores.

As soluções de trabalho contendo benznidazol e o padrão interno benzocaína foram preparadas de forma a obter uma concentração final igual a 5 µg/mL, concentração plasmática média do benznidazol. Foram utilizados então 900 µL de plasma, fortificados com 100 µL de solução padrão. Após dois minutos no vórtex, adicionaram-se diferentes volumes de agente precipitante para que fossem obtidas as proporções descritas na **Tabela 16**. As recuperações médias obtidas para cada teste, assim como o desvio padrão relativo das replicatas, estão apresentados nessa mesma tabela.

Tabela 16 – Resultados da otimização da etapa de precipitação de proteínas.

Agente precipitante	Proporção	Recuperação do benznidazol (%)	Recuperação do benzocaína (%)	DPR (n=3)
TCA 30% p/v	0,5:1	5,60%	11,05%	4,16%
	1:1	5,48%	10,51%	8,36%
	2:1	3,72%	5,69%	2,58%
TCA 10% p/v	0,5:1	8,88%	16,09%	4,96%
	1:1	10,02%	21,14%	5,91%
	2:1	9,15%	14,85%	1,76%
ACN	1:1	0,33%	0,70	12,92%
	2:1	0,34%	0,56	8,03%
	2,5:1	0,31%	0,53	8,03%

As amostras obtidas pela precipitação com ácido tricloroacético em acetonitrila apresentaram grande turvação, o que indica que a precipitação não foi bem-sucedida e, portanto, não foram submetidas à extração por MEPS e análise por CLAE a fim de evitar danos no cartucho extrator e na coluna cromatográfica.

Observa-se, a partir dos dados da **Tabela 16**, que a recuperação do analito pela precipitação com acetonitrila foi extremamente baixa. Esse resultado sugere que ocorre competição entre este agente precipitante no qual está presente a amostra e a fase extratora. Percebe-se que há uma maior afinidade

do benznidazol pelo eluente, o que diminui a sua retenção. A fim de obter recuperações mais altas com acetonitrila, procedeu-se à evaporação da acetonitrila após a precipitação e ressuspensão em 90% de água e 10% de acetonitrila, de forma a solubilizar o analito e, ao mesmo tempo, favorecer o equilíbrio no sentido da retenção do benznidazol na fase estacionária. A evaporação foi realizada em concentrador à vácuo, a 45 °C, por 2 horas. Os resultados médios estão apresentados na **Tabela 17**.

Tabela 17 – Resultados da otimização da etapa de precipitação com acetonitrila após evaporação e ressuspensão.

Agente precipitante	Proporção	Recuperação de benznidazol (%)	Recuperação de benzocaína (%)	DPR (n=3)
ACN	1:1	10,45%	18,35%	13,44%
	2:1	9,85%	17,20%	1,88%
	2,5:1	6,30%	10,60%	7,77%

A inserção de mais uma etapa de preparo de amostra, com um tempo superior a 2 horas, não se mostrou vantajosa. Portanto, optou-se pela escolha do agente precipitante ácido tricloroacético, na concentração de 10% p/v, na proporção de 1:1.

Otimizada a etapa de precipitação de proteínas, procedeu-se à otimização da etapa de extração por MEPS por meio de planeamento fatorial 2⁴. O planeamento fatorial 2⁴ combina todas as variáveis estudadas (4) em todos os níveis definidos (2). Baseando-se nos trabalhos de Siqueira; Fernandes; César (2020) e Viana *et al.* (2014), definiu-se como variáveis a serem otimizadas aquelas que possuem maior impacto na extração. Tendo já definido a fase extratora (C18) e otimizado a etapa de precipitação de proteínas, com diluição do plasma na proporção 1:1 com o agente precipitante, avaliou-se as seguintes variáveis: volume de plasma utilizado (x_1), número de ciclos de aspiração e ejeção da amostra (x_2), volume do solvente de dessorção (x_3), e o volume de aspiração da amostra (x_4). Os níveis avaliados foram: 500 μ L e 1000 μ L de

volume de plasma; 5 e 15 ciclos de aspiração e ejeção; 3 vezes 50 μL e 3 vezes 150 μL do solvente de dessorção; e 50 μL e 150 μL de volume de aspiração da amostra. Os experimentos foram divididos em dois blocos, sendo cada bloco realizado em um dia, e três replicatas no ponto central em cada bloco. O volume aspirado de sobrenadante foi igual ao nível da variável x_1 de cada experimento. Após a dessorção com acetonitrila, o eluato foi diluído com 60% de água ultrapurificada – proporção de água na fase móvel - antes da injeção em cromatógrafo a líquido de alta eficiência para evitar distorção do pico cromatográfico. A matriz com as variáveis codificadas e decodificadas estão apresentadas nas páginas 75 e 76. A recuperação de benznidazol foi avaliada por meio do software Design Expert versão 10.0.7.

Os gráficos apresentados a seguir fornecem informações sobre a influência de cada variável e suas interações para a recuperação de benznidazol. O gráfico “*Normal Plot*”, apresentado na **Figura 23**, apresenta a variável volume de aspiração de plasma, definida como “D” ou x_4 , como a variável que apresenta maior impacto na recuperação, uma vez que se apresenta mais afastada da linha próximo a zero do efeito padronizado. O impacto desta variável é facilmente observado pelo gráfico de Pareto, na **Figura 24**, em que o valor de t para o efeito é maior que o t limite, em 2,45. É possível observar que as demais variáveis, quando observadas independentemente, não exercem grande influência na recuperação, mas as interações entre elas são significativas. A interação de terceira ordem ACD, sendo ela as interações entre o volume de plasma aspirado, o volume de acetonitrila na dessorção e o volume de aspiração no plasma, é bastante significativa para a recuperação, assim como a interação também de terceira ordem BCD, entre números de ciclos, volume de acetonitrila na dessorção e volume de aspiração do plasma. Em seguida, observa-se a influência da variável de segunda ordem AC, entre volume de plasma e o volume de dessorção, estando relacionadas com a pré-concentração da amostra. Estas duas variáveis também são significativas de forma independente, mas não mais que a interação entre elas. As demais interações e a variável B (número de ciclos de aspiração), quando avaliada sozinha, não influenciam a recuperação, uma vez que o valor de t para o efeito é menor que o t limite, no gráfico de Pareto, ao

mesmo tempo que se apresentam próximos ao valor zero estabelecido pela linha no gráfico *Normal Plot*.

Figura 23 – Gráfico *Normal Plot* do Planejamento Fatorial 2⁴ para otimização da extração por MEPS.

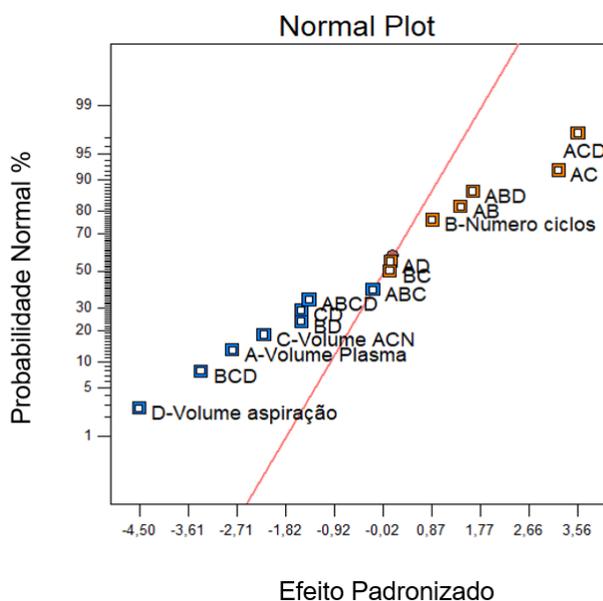
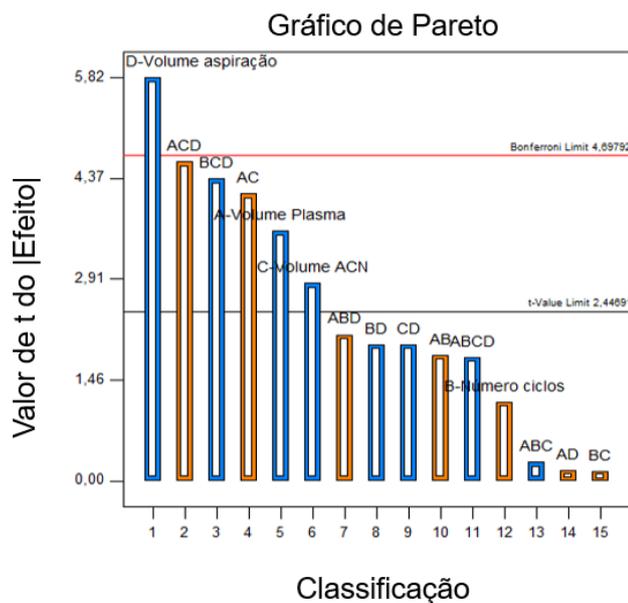


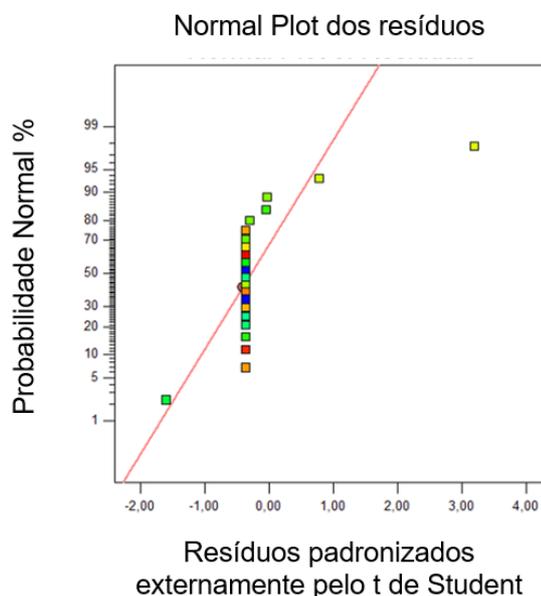
Figura 24 – Gráfico de Pareto do Planejamento Fatorial 2⁴ para otimização da extração por MEPS.



Foi realizada a Análise de Variância (ANOVA) dos resíduos pelo próprio software, que apresentou significância do modelo linear com valor de F igual 10,70 para probabilidade com o valor de p igual a 0,0080. A falta de ajuste do modelo apresentou o valor de F igual 0,13 para probabilidade com o valor de p igual a 0,7387, concluindo-se, portanto, que não há falta de ajuste. O coeficiente de determinação (r^2) foi igual a 0,9698.

Para a análise dos resíduos, obteve-se os gráficos *Normal Plot*, resíduos versus valores preditos, resíduos versus corrida, e valores preditos versus valores reais. A distribuição dos resíduos no gráfico *Normal Plot*, apresentado na **Figura 25**, demonstra que os resíduos padronizados pelo t de Student apresentam distribuição normal de probabilidade, uma vez que se encontram próximos à reta.

Figura 25 – Gráfico *Normal Plot* do Planejamento Fatorial 2^4 para otimização da extração por MEPS.



Observa-se na **Figura 26**, gráfico resíduos versus valores preditos, assim como na **Figura 27**, gráfico resíduos versus corrida, que os valores padronizados pelo t de Student dos resíduos estão dentro dos limites estabelecidos pelo t limite, designado pela linha vermelha no gráfico, o que indica que as

observações estão bem ajustadas ao modelo proposto. Além disso, o fato dos resíduos estarem próximos de zero indica pouca variação dos erros.

Figura 26 – Gráfico Resíduos vs Valores Preditos do Planejamento Fatorial 2^4 para otimização da extração por MEPS.

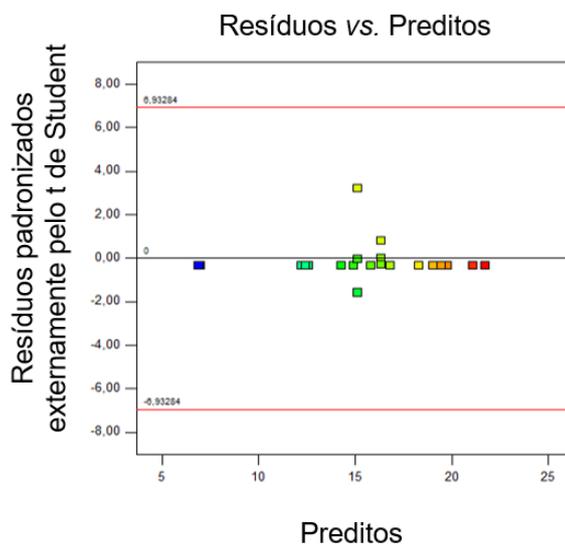
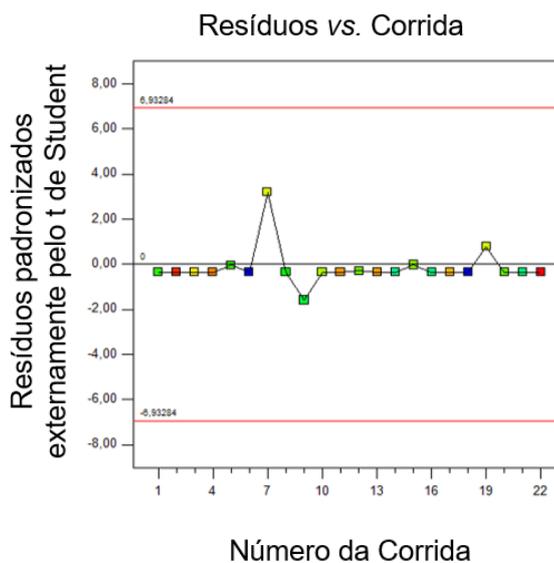
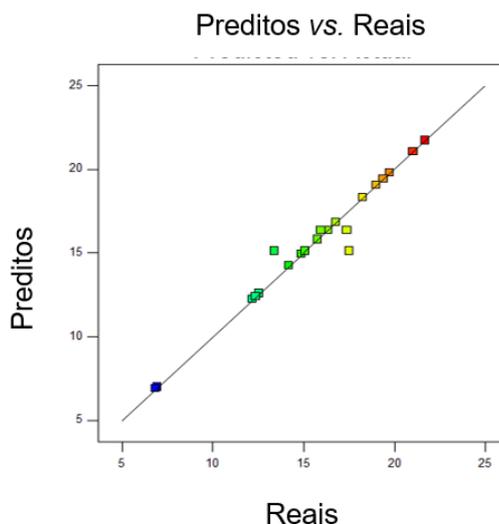


Figura 27 – Gráfico Resíduos vs Corrida do Planejamento Fatorial 2^4 para otimização da extração por MEPS.



Além disso, o gráfico valores preditos versus valores reais (**Figura 28**) demonstra boa correlação linear entre os valores preditos pelo modelo e os valores obtidos experimentalmente.

Figura 28 – Gráfico Valores Preditos vs Valores Reais do Planejamento Fatorial 2⁴ para otimização da extração por MEPS.

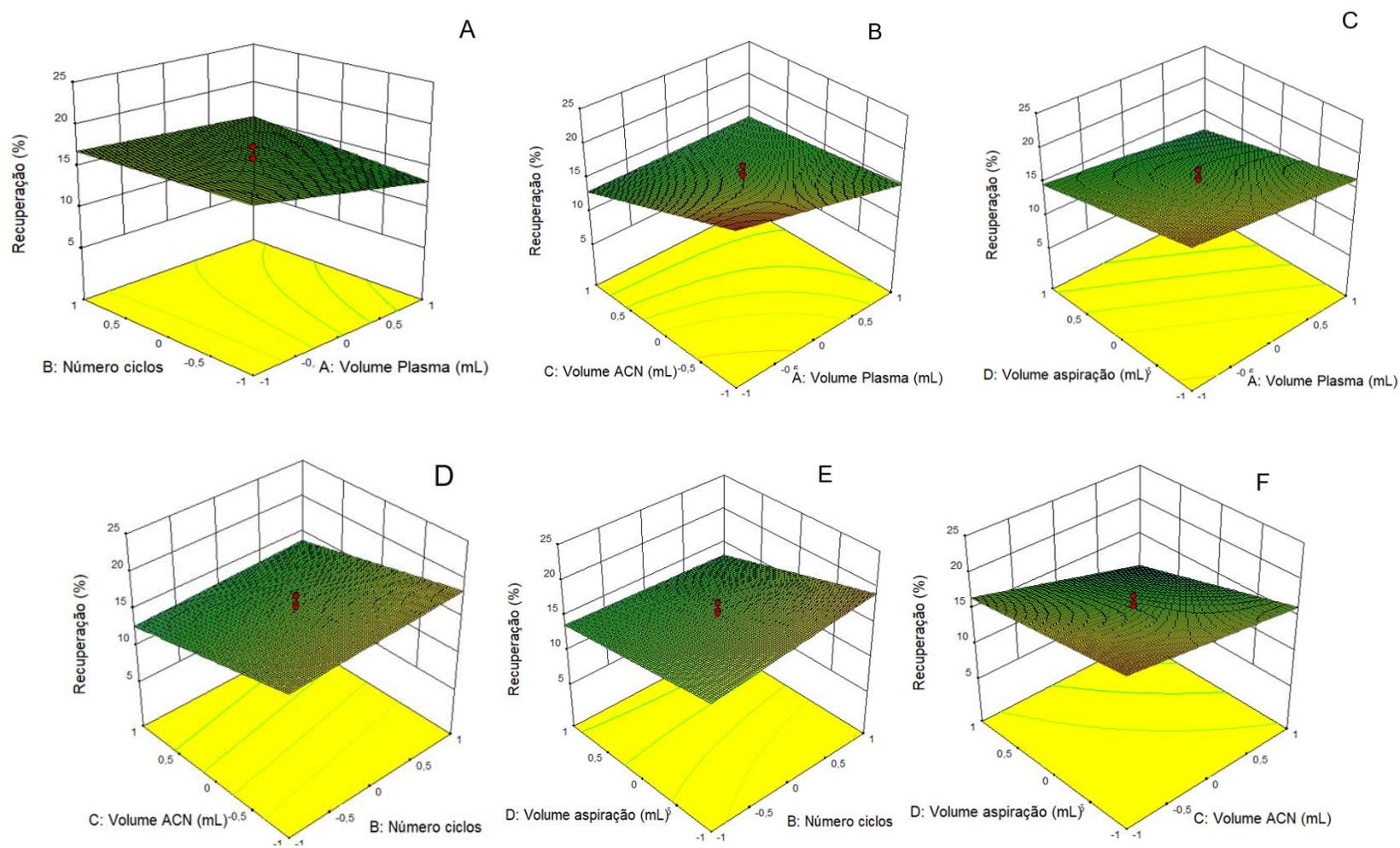


Os gráficos de superfície de resposta obtidos na otimização das condições de extração pelo planejamento fatorial 2⁴ estão na **Figura 29** a seguir. Na **Figura 29A**, observa-se ligeira inclinação, que indica que existe interação entre as variáveis: volume de plasma e número de ciclos. Entretanto, a maior parte da superfície de resposta apresenta-se verde, indicando baixa recuperação. Uma pequena área da superfície de resposta apresenta-se amarela, onde os resultados são mais favoráveis, referindo-se ao nível codificado -1 para o volume de plasma (500 µL) e indiferente para a variável número de ciclos, uma vez que ela se apresenta amarela na faixa de resposta para -1, 0 e +1. Na **Figura 29B**, já há a presença de uma área avermelhada, que indica respostas máximas, para as variáveis -1 para volume de plasma (500 µL) e -1 para volume de acetonitrila na etapa de dessorção (3 vezes de 50 µL). Novamente, a inclinação do gráfico demonstra interação entre as duas variáveis. A **Figura 29C** apresenta uma superfície alaranjada para a área com variável -1 para volume de plasma (500 µL) e -1 para volume de aspiração (50 µL). A análise da **Figura 29D** sugere que maiores recuperações são obtidas em volumes

menores de acetonitrila utilizada na dessorção (nível -1 para esta variável), mas com números de ciclos maiores ou igual a 10 (níveis 0 e +1 para variável B ou x_2). Na **Figura 29E**, analisando as variáveis número de ciclos e volume de aspiração da amostra, há maiores recuperações quando se utiliza maior número de ciclos e menor volume de aspiração. E, por fim, na **Figura 29F**, as recuperações são maiores quando se utiliza menor volume de aspiração da amostra e menor volume de dessorção.

As superfícies de resposta indicam que recuperações mais altas são obtidas com menores volumes de amostra e volume de dessorção, o que sugere que a técnica de MEPS é eficiente para pré-concentração da amostra. Como observado no gráfico de Pareto, a variável número de ciclos não influencia tanto a resposta de forma independente, mas a sua interação, principalmente com volume de dessorção e de aspiração do plasma, em terceira ordem, é bastante significativa.

Figura 29 – Superfícies de resposta do Planejamento Fatorial 2^4 para otimização da extração por MEPS.



Destarte, pode-se inferir que a análise multivariada por meio de planejamento fatorial não só permite a otimização de diversas variáveis em diferentes níveis simultaneamente, como também fornece informações sobre as interações entre estas variáveis que não seriam observadas em estudos univariados.

Utilizando-se a função desejabilidade do *software* Design Expert para seleção da melhor condição de extração, objetivando maiores recuperações, obteve-se as condições apresentadas na **Tabela 18**, com desejabilidade igual a 0,89.

Tabela 18 – Otimização das condições de extração por MEPS segundo a função desejabilidade do software Design Expert.

Variável	Nível codificado	Nível real
Volume de plasma	-0,99	500 µL
Número de ciclos	-0,32	10
Volume de ACN para dessorção	-0,99	3 x 50 µL
Volume de aspiração da amostra	0,14	100 µL
Recuperação prevista	21,32%	

As condições ótimas obtidas por meio do planejamento experimental indicam que um menor volume de plasma apresenta maiores recuperações, o que pode ser explicado pela passagem de toda amostra pelo sorvente, permitindo que o analito seja mais extraído. Observa-se também que o número de ciclos intermediário, assim como o volume intermediário de aspiração da amostra, é suficiente para uma boa recuperação, uma vez que maiores números de ciclos e volume de aspiração de amostra não refletiram em maiores ganhos. O volume menor de solvente de dessorção produziu melhores resultados, uma vez que o analito é pré-concentrado. Dessa forma, as variáveis volume de plasma e volume de acetonitrila para dessorção apresentaram, por meio do planejamento fatorial, resultados esperados, enquanto as variáveis números de

ciclos e volume de aspiração da amostra demonstram que nem sempre valores mais altos resultam em maiores recuperações.

Foi então realizado um teste, em triplicata, nas condições acima tabeladas e avaliada a recuperação. Obteve-se uma recuperação de 24,64% para benznidazol e de 38,13% para o padrão interno, sendo a razão analito/padrão interno igual a 0,65. Como pode-se perceber, a recuperação obtida foi bem próxima do valor previsto no teste de desejabilidade.

Visando favorecer o aumento da extração do benznidazol pelo sorvente, e preservar o cartucho de extração de grandes variações de pH, procedeu-se aos testes com uso de tampão acetato 0,01 mol/L pH 4,0. O tampão foi utilizado no preparo das soluções de benznidazol e padrão interno, na proporção de 80% para 20% de acetonitrila na solução estoque e 90% de tampão para 10% de acetonitrila nas soluções de trabalho, além do seu uso na etapa de lavagem dos interferentes. Obteve-se uma recuperação média de 11,61% de benznidazol. Tais resultados foram menores do que os obtidos utilizando-se água ao invés de tampão, cuja recuperação média foi igual a 24,64% (obtida pela otimização do planejamento fatorial).

Também foi testada uma concentração maior do tampão acetato, em 0,05 mol/L, em pH 4,0, adicionando o tampão ao sobrenadante obtido após a etapa de precipitação de proteínas para maior efeito tamponante. O tampão foi adicionado nas proporções 0,5:1 e 1:1 de tampão para sobrenadante. Entretanto, os valores de pH medidos foram iguais a 0,81 para a proporção de 0,5:1 e de 0,86 para a proporção de 1:1. Além disso, as recuperações ainda se mantiveram menores do que as obtidas com água: 14,23% para a proporção de 0,5:1 e de 16,24% para a proporção de 1:1.

Testou-se, ainda, a utilização do tampão TRIS em pH 9,40 que, após mistura com o sobrenadante do precipitado na proporção de 1:1, apresentou pH igual a 0,95. Porém, os valores obtidos para a recuperação foram ainda menores: 8,97%, na média.

Assim sendo, optou-se pela não-utilização de tampão a fim de obter maiores recuperações. Os cartuchos de C18 à base de sílica sofreram maiores deteriorações com a utilização do ácido tricloroacético como agente precipitante e água e acetonitrila no preparo das soluções, e, portanto, tiveram menor tempo de vida útil. Entretanto, mesmo em pH baixo, foi possível realizar cerca de 50 extrações por cartucho.

Para fins de comparação, foram realizados dois testes utilizando SPE convencional, utilizando cartuchos Strata® e Hydra® C18. Foram realizadas triplicatas em cada cartucho, aplicando-se 1 mL de solução padrão de benznidazol a 20 µg/mL, em 80% de tampão acetato pH 4,0 e 20% de acetonitrila. Obteve-se uma recuperação média de 97,1% de benznidazol para análises realizadas em cartuchos Strata®, e de 86,4% para as análises realizadas em cartuchos Hydra®. A maior recuperação do cartucho Strata® se deve à maior quantidade de sorvente (500 mg, enquanto o cartucho Hydra® contém somente 100 mg) do cartucho.

Como era esperado, a recuperação obtida com a SPE convencional é superior àquela obtida com a MEPS. Isso se deve, principalmente à quantidade superior de sorvente presente nos cartuchos de SPE. Entretanto, como será demonstrado na aplicação do método MEPS desenvolvido na análise de amostras de plasma, esta técnica, apesar de empregar apenas 2 mg de sorvente, foi capaz de extrair uma quantidade de analito suficiente para determinação em amostras reais.

Além disso, apesar da alta recuperação obtida, a SPE convencional apresenta a desvantagem da utilização de cartuchos descartáveis, além do alto consumo de solvente de alto grau de pureza.

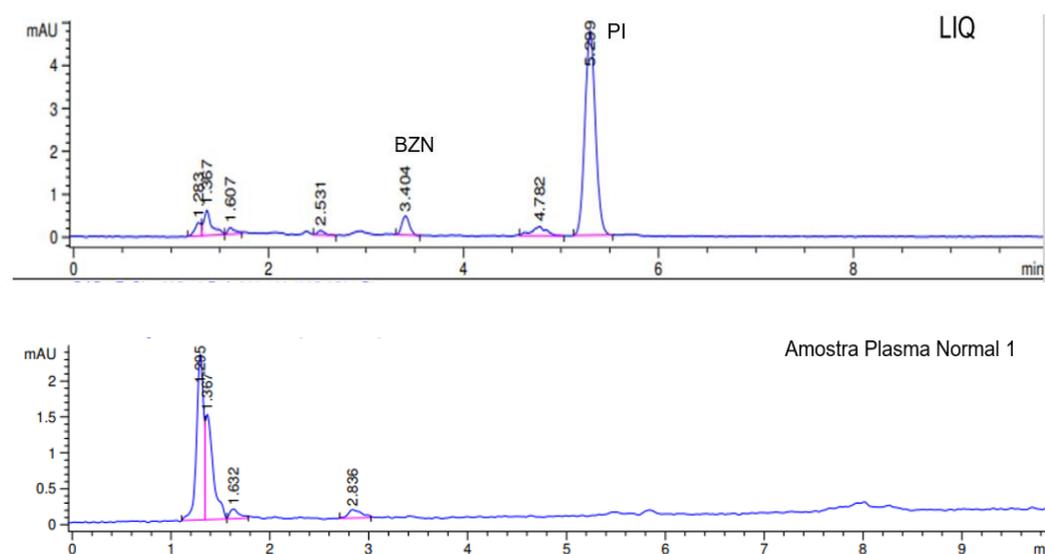
6.4 Validação de método bioanalítico por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência para análise de benznidazol em plasma humano

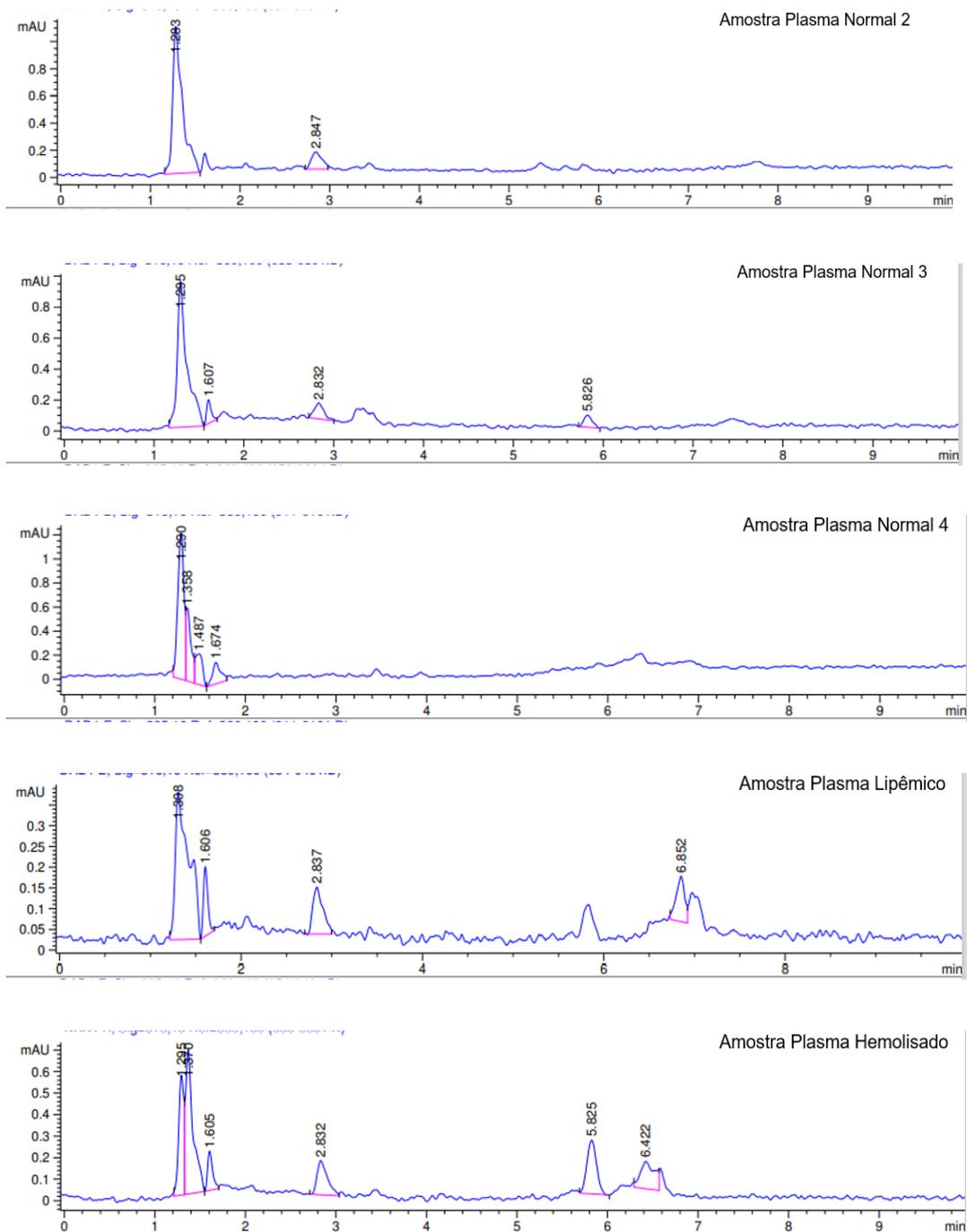
O método desenvolvido para análise de benznidazol em plasma humano, utilizando precipitação de proteínas e MEPS no preparo de amostras e cromatografia líquida com detecção no ultravioleta nas etapas de separação e detecção, foi validado conforme a RDC 27/2012 da ANVISA. Os parâmetros validados foram: seletividade, efeito residual, efeito matriz, curva de calibração, precisão (intra-corrída e inter-corrídas), exatidão e estabilidade. Os resultados da validação bioanalítica são discutidos a seguir.

6.4.1 Seletividade

Para avaliação da seletividade, foram analisadas quatro amostras de plasma branco (normais), uma amostra lipêmica e uma amostra hemolisada. Essas amostras foram submetidas aos procedimentos de precipitação de proteínas e extração por MEPS e posteriormente analisadas por CLAE-UV. Os cromatogramas para cada amostra estão na **Figura 30**.

Figura 30 – Cromatogramas das amostras normais, lipêmica e hemolisada e no LIQ para análise de seletividade do método bioanalítico.



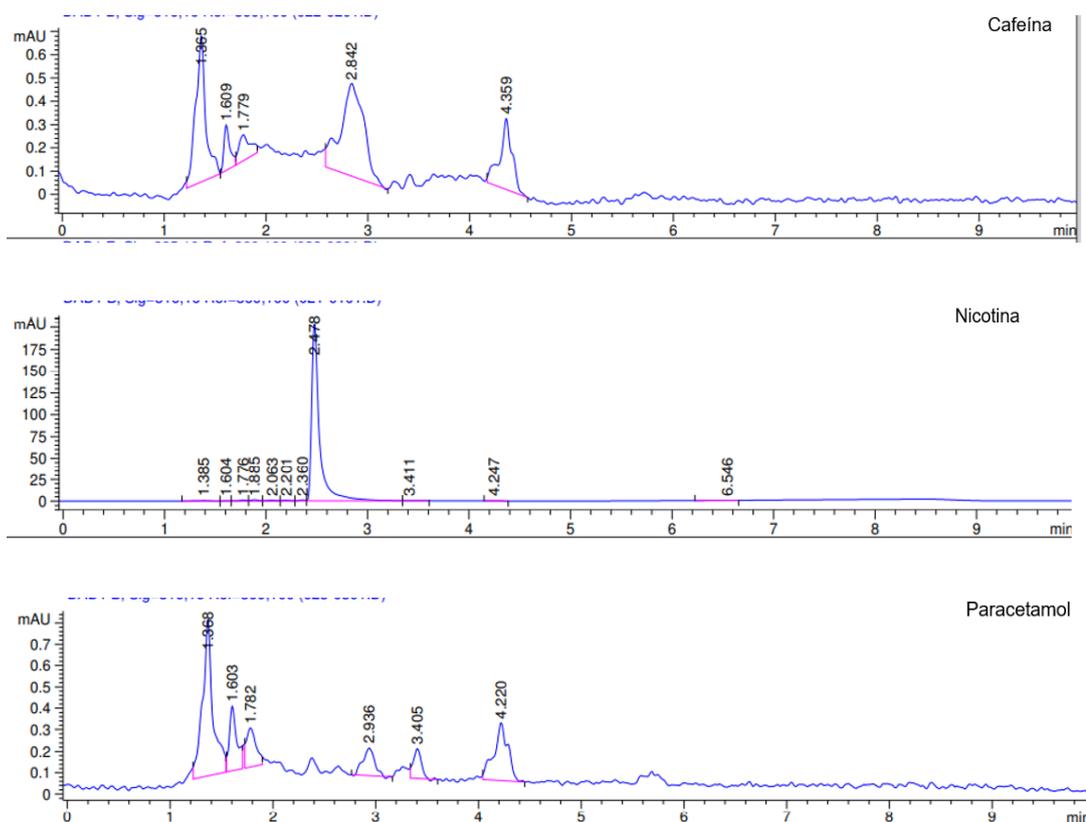


A partir da análise dos cromatogramas obtidos, observam-se cromatogramas sem picos interferentes nos tempos de retenção do analito e do padrão interno, além de baixo ruído.

Também foram analisadas amostras de plasma fortificadas com cafeína, nicotina e paracetamol, a fim de comprovar a seletividade do método para os

potenciais interferentes presentes na circulação sanguínea da maioria dos indivíduos. As concentrações analisadas foram: 1 µg/mL de cafeína, 10 ng/mL de nicotina, e 20 µg/mL de paracetamol, concentrações plasmáticas usuais destes analitos. Os cromatogramas obtidos estão na **Figura 31**.

Figura 31 – Cromatogramas das amostras fortificadas com cafeína, nicotina e paracetamol para análise de seletividade do método bioanalítico.

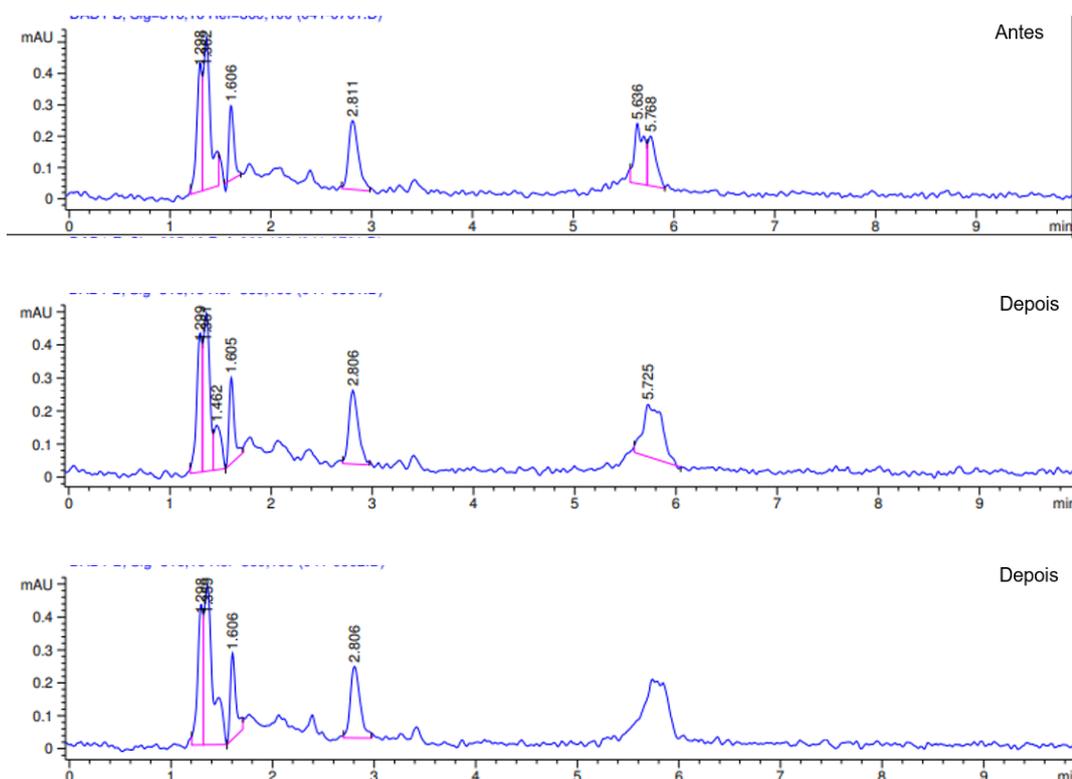


Os cromatogramas das amostras de cafeína e nicotina não apresentaram picos interferentes próximo aos tempos de retenção do analito e do padrão interno, demonstrando a seletividade do método. No cromatograma da amostra de paracetamol, eluiu um pico com tempo de retenção de 3,405, próximo ao tempo de retenção do pico do benznidazol. Entretanto, a área é inferior a 20% da área do benznidazol, como preconizado pela RDC 27/2012.

6.4.2 Efeito Residual

Para análise do efeito residual, ou *carry-over*, foram realizadas três injeções de uma mesma amostra branco, sendo uma antes e duas após a injeção da amostra de concentração igual ao Limite Superior de Quantificação (LSQ), definido em 6,0 µg/mL. Foi avaliado se havia a presença de picos no tempo de retenção do analito e padrão interno e suas respectivas áreas. Os cromatogramas das três injeções da amostra branco estão apresentados na **Figura 32**.

Figura 32 – Cromatogramas da amostra branco para análise de efeito residual do método bioanalítico.



É possível inferir, a partir da análise visual dos cromatogramas, que não há efeito residual ou *carry-over* no método utilizado, uma vez que não se observa picos nos tempos de retenção do analito e do padrão interno, apenas um ligeiro ruído.

6.4.3 Efeito Matriz

O efeito matriz foi avaliado por meio do cálculo do fator de matriz normalizado (FMN), dos resultados obtidos para as amostras de CQB e CQA, e os resultados, assim como os DPR para cada amostra, estão na **Tabela 19**.

Tabela 19 – Fatores de Matriz Normalizados e Desvios Padrão Relativo para análise de efeito matriz do método bioanalítico.

Amostra	FMN	
	CQB	CQA
Normal 1	0,2561	1,2439
Normal 2	0,2564	1,2447
Lipêmico	0,2561	1,2437
Hemolisado	0,2564	1,2445
Média	0,2562	1,2442
DPR	0,1048	0,0571

Segundo a RDC 27/2012, a matriz não causa efeito na resposta do analito ou do padrão interno se o DPR for inferior a 15%. Dessa forma, o método bioanalítico desenvolvido não apresenta efeito matriz.

6.4.4 Curva de Calibração

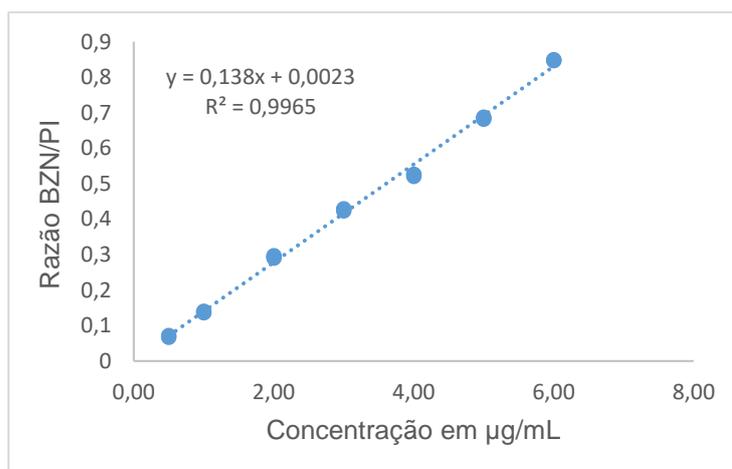
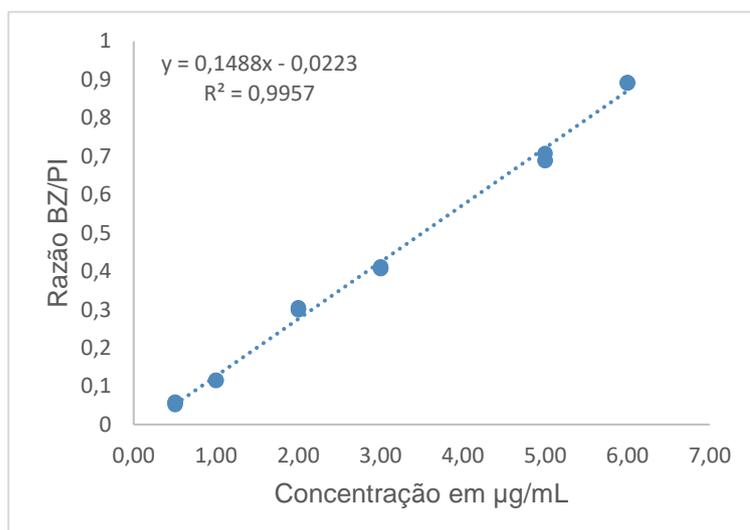
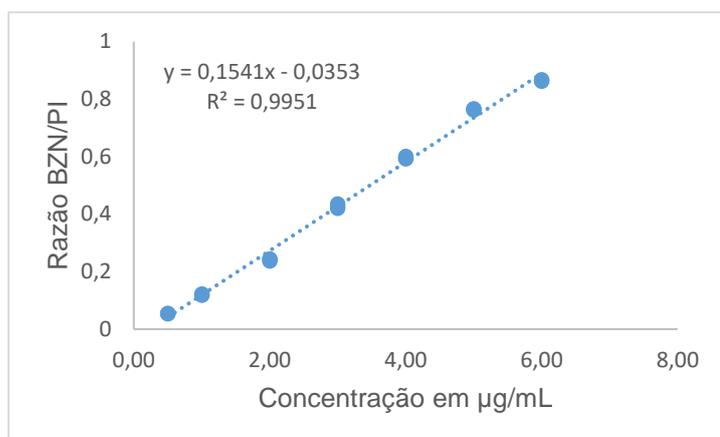
Foram construídas três curvas de calibração nas concentrações de 0,5 µg/mL a 6,0 µg/mL para avaliação da linearidade. As curvas foram plotadas segundo as razões das áreas do analito pelas áreas do padrão interno em função da concentração. Os valores obtidos para cada nível da curva foram avaliados de acordo com o preconizado pela RDC 27/2012, sendo eles: desvio menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal para amostras no Limite Inferior de Quantificação (LIQ) e desvio menor a 15% em relação à concentração nominal para as amostras nos demais níveis de concentração. Os desvios em relação à concentração nominal estão apresentados na **Tabela 20**. A partir desta

análise, identificou-se um valor *outlier*, sendo ele o nível 4,0 µg/mL da segunda curva analisada. Estes valores foram devidamente excluídos e as três curvas plotadas. As três curvas obtidas na avaliação da linearidade estão apresentadas na **Figura 33**.

Tabela 20 – Desvios em relação à concentração nominal para avaliação da linearidade do método analítico.

Concentração			
Nominal (µg/mL)	Curva 1	Curva 2	Curva 3
0,5	-15,58%	-4,54%	2,66%
1,0	-0,47%	7,33%	1,74%
2,0	10,43%	-9,04%	-5,52%
3,0	-0,03%	3,41%	-2,43%
4,0	-2,37%	24,06%	5,55%
5,0	-3,78%	3,49%	1,13%
6,0	2,68%	-2,44%	-2,10%

Figura 33 – Curvas de calibração obtidas para avaliação da linearidade do método bioanalítico.



Observa-se, a partir da análise dos gráficos, que há correlação linear, com coeficientes de determinação (r^2) acima de 0,99. Segundo os critérios de aprovação da RDC 27/2012, as três curvas de calibração estão aprovadas, uma vez que apresentam mais de 75% dos pontos da curva aprovados com desvio inferiores a 15% e 20% no LIQ, e seis pontos de calibração, incluindo LIQ e LSQ.

6.4.5 Precisão

A análise da precisão foi realizada em cinco níveis, sendo eles: LIQ (0,5 µg/mL), CQB (1,0 µg/mL), CQM (3,0 µg/mL), CQA (5,0 µg/mL) e CQD (8,0 µg/mL). Foram realizadas triplicatas em cada nível de concentração por dia de análise. Para análise da precisão intradia ou intracorrída, calculou-se os DPR de cada nível, em cada corrida analítica. Para a análise da precisão intermediária, ou intercorridas, os cinco níveis de concentração foram analisados por três dias, em triplicata por dia de análise, obtendo-se o DPR de cada nível das 9 amostras analisadas. Os valores médios obtidos na precisão intracorrída e intermediária estão na **Tabela 21**.

Tabela 21 – Desvios Padrão Relativos (DPR) para avaliação da precisão do método analítico.

Nível de Concentração	Dia 1 (n=3)	Dia 2 (n=3)	Dia 3 (n=3)	Precisão Intermediária (n=9)
LIQ	11,77%	9,89%	7,40%	11,64%
CQB	11,73%	5,03%	2,15%	9,31%
CQM	6,60%	9,60%	5,76%	10,67%
CQA	0,69%	2,78%	7,74%	5,17%
CQD	7,15%	6,75%	5,46%	8,06%

A partir dos dados da **Tabela 21**, observa-se que não há DPR superior a 15%, nem mesmo no Limite Inferior de Quantificação (LIQ), para o qual aceita-se, segundo RDC 27/2012, até 20% de desvio. Portanto, conclui-se que o método analítico apresenta precisão intra e intercorridas.

6.4.6 Exatidão

A exatidão do método bioanalítico foi demonstrada por meio do cálculo de Erro Padrão Relativo (EPR) em relação à concentração nominal das amostras analisadas no ensaio de precisão. Os Erros Padrão Relativos obtidos para os cinco níveis de concentração (LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD) estão apresentados na **Tabela 22**. É importante salientar que para o cálculo da concentração média determinada, utilizou-se a equação da reta obtida pela curva de calibração 3, cujo ensaio foi realizado próximo ao ensaio para precisão e exatidão.

Tabela 22 – Erros Padrão Relativos (EPR) para avaliação da exatidão do método analítico.

Nível de Concentração	Dia 1		Dia 2		Dia 3		Exatidão Intracorridas	
	CMD (µg/mL)	EPR	CMD (µg/mL)	EPR	CMD (µg/mL)	EPR	CMD (µg/mL)	EPR
LIQ	0,54	7,50%	0,61	15,63%	0,53	0,93%	0,56	12,00%
CQB	0,95	-4,79%	1,10	9,59%	1,09	9,37%	1,05	4,72%
CQM	2,60	-13,36%	3,04	1,48%	3,10	3,30%	2,91	-2,86%
CQA	5,01	0,27%	5,27	5,44%	5,00	-0,05%	5,09	1,89%
CQD	7,20	-9,99%	7,56	-5,51%	8,14	1,79%	7,63	-4,57%

Legenda: CMD – Concentração Média Determinada; EPR – Erro Padrão Relativo.

Segundo a RDC 27/2012 da ANVISA, o Erro Padrão Relativo não pode ser superior a 15% das concentrações nominais, exceto no LIQ em que se aceita até 20%. Uma vez que não se observa valores superiores ao permitido, conclui-se que o método bioanalítico desenvolvido apresenta exatidão adequada.

6.4.7 Estabilidade do analito e do padrão interno em solução

Para análise de estabilidade em solução, foram analisadas três amostras da solução primária de benznidazol e de padrão interno e três amostras da solução de trabalho na concentração do Limite Inferior de Quantificação (LIQ). Uma vez que a solução primária foi preparada na concentração de 1 mg/mL, uma concentração bastante alta para análise em sistema cromatográfico, as amostras destas soluções foram diluídas para 5,0 µg/mL. Todas as amostras foram injetadas logo após o preparo e após um dia, para a solução primária, e após três dias, para as soluções de trabalho, pois foi observado um decaimento da solubilidade na solução primária de benznidazol, após três dias. Tal decaimento pode ter ocorrido pela baixa concentração de acetonitrila na solução, solvente no qual o fármaco é mais solúvel. Entretanto, o baixo percentual deste solvente é necessário para que o deslocamento do equilíbrio seja favorecido no sentido da retenção do fármaco pela fase estacionária. A diferença de concentração para a estabilidade em solução primária, diluída para 5,0 µg/mL, foi igual a -0,71%, com DPR igual a 0,50%. Para a estabilidade em solução de trabalho na concentração do LIQ, a diferença de concentração foi igual a -6,97%, com DPR de 4,76%.

Uma vez que as diferenças de concentração iniciais e finais foram menores que 10%, como preconizado pela RDC 27/2012, conclui-se que o analito e o padrão interno são estáveis se observados o uso de soluções primárias em até um dia e o uso das soluções de trabalho até três dias.

6.4.8 Estabilidade em matriz biológica

A estabilidade do analito em matriz biológica foi avaliada e validada por meio de ensaios de curta e longa duração, de ciclos de congelamento e descongelamento e estabilidade pós-processamento, além da estabilidade do analito em solução, nos níveis de CQB e CQA, em triplicata.

Inicialmente, as amostras de estabilidade foram fortificadas com analito e padrão interno e submetidas às condições de estabilidade de cada ensaio. Os resultados obtidos nessas condições demonstraram uma redução da área do padrão interno pela metade, indicando que, provavelmente, o fármaco benzocaína havia se ligado e precipitado com as proteínas plasmáticas. Ao mesmo tempo, observou-se que as amostras que sofreram precipitação de proteínas logo após a etapa de fortificação do plasma, apresentavam maior estabilidade. Destarte, procedeu-se à análise de estabilidade com as amostras fortificadas e precipitadas com ácido tricloroacético 10% p/v na proporção de 1:1 e, em seguida, centrifugadas. A estabilidade foi medida pela diferença percentual da razão entre as concentrações médias determinadas no tempo zero e após as condições de estabilidade descritas na seção de métodos. A diferença das razões das áreas de benznidazol e padrão interno, nos ensaios em que se adicionaram o padrão interno e procedeu-se imediatamente à etapa de precipitação, estão contidas na **Tabela 23**.

Tabela 23 – Diferença das razões das áreas do analito e padrão interno nas condições iniciais e finais para análise de estabilidade em matriz biológica.

Ensaio	CQB		CQA	
	Diferença entre as razões BZN/PI	DPR	Diferença entre as razões BZN/PI	DPR
Curta Duração	-0,59%	0,42%	9,35%	6,94%
Longa Duração	1,50%	1,07%	-2,00%	1,40%
Pós-Processamento	6,27%	4,58%	11,80%	8,87%

. Para a análise de estabilidade de ciclos de congelamento e descongelamento foi realizado um ensaio com a amostra fortificada somente com o analito, simulando uma amostra real, em três ciclos de congelamento e descongelamento, e um ensaio com a amostra fortificada com analito e padrão interno, submetida à precipitação e centrifugação, em um único ciclo de

congelamento e descongelamento. No primeiro ensaio, o padrão interno foi adicionado às amostras ao final dos três ciclos de congelamento e descongelamento, realizando-se a etapa de precipitação imediatamente após. Os resultados do ensaio de estabilidade de ciclos de congelamento e descongelamento estão na **Tabela 24**.

Tabela 24 – Diferença das razões das áreas do analito e padrão interno nas condições iniciais e finais para análise de estabilidade de ciclos de congelamento e descongelamento.

Ensaio	CQB		CQA	
	Diferença entre as razões BZN/PI	DPR	Diferença entre as razões BZN/PI	DPR
Ciclos de Congelamento e Descongelamento (1 ciclo)	4,26%	3,07%	5,29%	3,85%
Ciclos de Congelamento e Descongelamento (3 ciclos)	-2,25%	1,57%	-11,34%	7,59%

De acordo com a RDC 27/2012 da ANVISA, a estabilidade é demonstrada quando não se observa perda superior a 15%. Assim sendo, o analito é estável em matriz biológica, quando observada rigorosamente a etapa de precipitação logo após a adição do padrão interno.

6.5 Aplicação de método bioanalítico desenvolvido e validado para análise de benznidazol em plasma humano

A fim de demonstrar a aplicação do método bioanalítico desenvolvido e validado, procedeu-se à análise de amostras de voluntários sadios que receberam dose oral de benznidazol, de acordo com seu peso corporal. As

concentrações plasmáticas foram calculadas por meio da equação da reta obtida e os resultados dos três voluntários estão apresentados na **Tabela 25**.

Tabela 25 – Concentrações plasmáticas de benznidazol de voluntários sadios que administraram o fármaco.

Voluntário	Concentração Plasmática de Benznidazol ($\mu\text{g/mL}$)
1	2,66
2	2,49
3	3,63

As concentrações plasmáticas encontradas estão de acordo com as faixas descritas por Altcheh *et al.* (2014) e Marson *et al.* (2013), de 3 a 6 $\mu\text{g/mL}$, e por Raaflaub; Ziegler (1979), de 2,2 a 2,8 $\mu\text{g/mL}$, o que demonstra que o método desenvolvido e validado poderá ser utilizado na prática clínica, para fins de monitorização terapêutica, estudos farmacocinéticos e de bioequivalência.

Em relação aos métodos já descritos para análise de benznidazol em plasma (vide página 56), o método desenvolvido neste trabalho apresentou Limite de Quantificação de 0,5 $\mu\text{g/mL}$, dentro da faixa encontrada por outros autores que utilizaram a técnica HPLC/UV, de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ a 1,6 $\mu\text{g/mL}$. Em relação à técnica miniaturizada IL-DLLME, descrita por Padró *et al.* (2013), os valores de LQ e recuperação foram inferiores aos obtidos no presente trabalho. Entretanto, a MEPS apresenta maior facilidade de execução que a IL-DLLME.

7 CONCLUSÃO

No presente trabalho está descrito o desenvolvimento de método analítico e bioanalítico para a análise de benznidazol em plasma humano, visando a monitorização terapêutica e estudos farmacocinéticos. Ambos os métodos foram validados segundo legislação vigente, publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

A etapa de preparo de amostras, crucial para a obtenção de resultados fidedignos, foi desenvolvida e otimizada utilizando-se os procedimentos de precipitação de proteínas e microextração por sorvente empacotado. Foi utilizado planejamento fatorial completo 2^4 para otimização racional da etapa de extração por MEPS, objetivando encontrar a melhor condição de análise em que se obtém maiores recuperações e menor interferência. O planejamento forneceu uma condição ótima, cuja recuperação máxima obtida foi igual a 24,6%.

Conclui-se que a utilização de MEPS no preparo de amostras resultou em cromatogramas com menos picos interferentes e baixo ruído, demonstrando uma maior seletividade, principalmente em relação às técnicas de precipitação de proteínas e LLE convencionais. A técnica, embora dispendiosa e com baixa recuperação, ainda se apresenta vantajosa em relação à SPE convencional, uma vez que o dispositivo MEPS, incluindo o cartucho comercial, pode ser reutilizado, enquanto à SPE convencional utiliza cartuchos descartáveis. Esta última, ainda, utiliza volumes maiores de solventes tóxicos e de alto grau de pureza, que são prejudiciais ao analista e ao meio ambiente.

O método bioanalítico desenvolvido foi aplicado em três voluntários sadios que administraram benznidazol e mostrou-se efetivo e robusto.

Ademais, trata-se da primeira vez que em que é relatado a utilização de extração em fase sólida convencional e de MEPS para a análise de benznidazol, que pode levar à implementação de técnicas mais modernas na rotina de laboratórios de análises clínicas.

REFERÊNCIAS

ABDEL-REHIM, M. New trend in sample preparation: On-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications I. Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 801, n. 2, p. 317–321, 2004.

ABDEL-REHIM, M. Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2569–2580, 2010.

ALTCHEH, J. MOSCATELLI, Guillermo; MASTRANTONIO, Guido; MORONI, Samanta; GIGLIO, Norberto; MARSON, Maria Elena; BALLERING, Griselda; BISIO, Margarita; KOREN, Gideon; GARCÍA-BOURNISSEN, Facundo. Population Pharmacokinetic Study of Benznidazole in Pediatric Chagas Disease Suggests Efficacy despite Lower Plasma Concentrations than in Adults. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 5, p. 1–10, 2014.

AZAMBUJA, P.; GARCIA, E. S. Ciclo Evolutivo. Portal da Doença de Chagas. **Fiocruz**. 2017. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/parasita/ciclo-evolutivo/>.

BEDOR, D. C. G.; BEDOR, N. C. T. C.; DA SILVA, J. W. V.; SOUSA, G. D.; DE SANTANA, D. P.; GARCÍA-BOURNISSEN, F.; ALTCHEHC, J.; BLUMD, B.; ALVES, F.; RIBEIRO, I. Dried blood spot technique-based liquid chromatography-tandem mass spectrometry method as a simple alternative for benznidazole pharmacokinetic assessment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 12, 2018.

BONFIGLIO, R.; KING, R.; OLAH, T. V.; MERKLE, K. The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 13, n. 12, p. 1175–1185, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: Rename 2020** [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília: Ministério da Saúde, 2020. 217 p. 2020.

BULFFER, R. F.; CASTRO, J. A.; FANE, S. L. Benznidazole levels in blood vary with age in rats. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 3, p. 374–377, 2011.

CALDAS, S. S.; GOLÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R. Principais técnicas de preparo de amostra para

a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604–1617, 2011.

CÉSAR, Isabela da Costa. **DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE ARTEMETER E LUMEFANTRINA EM COMPRIMIDOS DE DOSE FIXA COMBINADA E EM PLASMA HUMANO**. 2009. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

CHANG, M. S.; JI, Q.; ZHANG, J.; EL-SHOUBAGY, T. A. Platforms and networks in triterpenoid pharmacology. **Drug Development Research**, v. 68, n. 4, p. 174–182, 2007.

CHEN, L.; WANG, H.; ZENG, Q.; XU, Y.; SUN, L.; XU, H.; DING, L. On-line coupling of solid-phase extraction to liquid chromatography-A review. **Journal of Chromatographic Science**, v. 47, n. 8, p. 614–623, 2009.

CHISVERT, A.; CÁRDENAS, S.; LUCENA, R. Dispersive micro-solid phase extraction. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 112, p. 226–233, 2019.

DA SILVA, P. H. R. DINIZ, M. L. V.; PIANETTI, G. A.; CÉSAR, I. C.; SILVA, M. E. S. R.; FREITAS, R. F. S.; SOUSA, R. G. de; FERNANDES, C. Molecularly imprinted polymer for determination of lumefantrine in human plasma through chemometric-assisted solid-phase extraction and liquid chromatography. **Talanta**, v. 184, p. 173–183, 2018.

DA SILVA, R. M.; OLIVEIRA, L. T.; BARCELLOS, N. M. S.; SOUZA, J.; LANA, M. Preclinical monitoring of drug association in experimental chemotherapy of Chagas' disease by a new HPLC-UV method. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 3344–3348, 2012.

DAVANÇO, M. G. **FARMACOCINÉTICA DO BENZNIDAZOL ADMINISTRADO EM COELHOS NA FORMA DE COMPRIMIDOS DE LIBERAÇÃO IMEDIATA E COMPRIMIDOS DE LIBERAÇÃO PROLONGADA**. 2015. Dissertação (Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Araraquara. 2015.

DAVANÇO, M. G.; DE CAMPOS, M. L.; PECCININI, R. G. Rapid and sensitive ultra-high-pressure liquid chromatography method for quantification of antichagasic benznidazole in plasma: Application in a preclinical pharmacokinetic study. **Biomedical Chromatography**, v. 29, n. 7, p. 1008–1015, 2015.

DE RYCKER, M.; BARAGAÑA, B.; DUCE, S. L.; GILBERT, I. H. Challenges and recent progress in drug discovery for tropical diseases. **Nature**, v. 559, n. 7715, p. 498–506, 2018.

DE SOUZA, K. C.; ANDRADE, G. F.; VASCONCELOS, I.; VIANA, I. M. O.; FERNANDES, C.; SOUSA, E. M. B. Magnetic solid-phase extraction based on mesoporous silica-coated magnetic nanoparticles for analysis of oral antidiabetic

drugs in human plasma. **Materials Science and Engineering C**, v. 40, p. 275–280, 2014.

DE SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G.; GINN, R. Analysis of semicarbazide in baby food by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) - In-house method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1077, n. 2, p. 151–158, 2005.

DE SOUZA, S. V. C.; PINTO, C. T.; JUNQUEIRA, R. G. In-house method validation: Application in arsenic analysis. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 3–4, p. 241–247, 2007.

DIAS, João Carlos Pinto *et al.* II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 25, n. esp, p. 7-86, jun. 2016.

DORSEY, J. G.; DILL, K. A. The Molecular Mechanism of Retention in Reversed-Phase Liquid Chromatography. **Chemical Reviews**, v. 89, n. 2, p. 331–346, 1989.

DRUGBANK. Benznidazole. 2020. Disponível em: <https://go.drugbank.com/drugs/DB11989>.

FAGUNDES, V. F.; LEITE, C. P.; PIANETTI, G. A.; FERNANDES, C. Rapid and direct analysis of statins in human plasma by column-switching liquid chromatography with restricted-access material. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 947–948, n. 1, p. 8–16, 2014.

FIOCRUZ. **Doença de Chagas**. Rio de Janeiro, 10 set. 2013. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7a-de-chagas>. Acesso em: 10 ago. 2020.

FU, X.; LIAO, Y.; LIU, H. Sample preparation for pharmaceutical analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 381, n. 1, p. 75–77, 2005.

GUERRERO, L.; PINAZO, M. J.; POSADA, E.; GASCO, J. RIBAS, J.; SOY, D. A high-performance liquid chromatographic method for benznidazole quantitation in plasma of patients with Chagas disease. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 49, n. 1, p. 77–82, 2011.

I. MOLINA, A. , SALVADOR, F.; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A. S; ARTAZA, M. A.; MORENO, R.; PERIN, L.; ESQUISABEL, A.; PINTO, L.; PEDRAZ, J. L. Pharmacokinetics of Benznidazole in Healthy Volunteers and Implications in Future Clinical Trials. **American Society for Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1–7, 2017.

LEONARDI, D.; BOMBARDIERE, M. E.; SALOMON, C. J. Effects of benznidazole: Cyclodextrin complexes on the drug bioavailability upon oral administration to rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 543–548, 2013.

LI, K.; RIVORY, L.; CLARKE, S. Solid-Phase Extraction (SPE) Techniques for Sample Preparation in Clinical and Pharmaceutical Analysis: A Brief Overview. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 2, n. 2, p. 95–102, 2006.

LIU, Y.; LIU, Z.; XU, Z.; LI, G. Stir Bar Sorptive Extraction Technology. **Progress in Chemistry**, v. 32, n. 9, p. 1334–1343, 2020.

LUIZ, A. L.; MACIEL, E. V. S.; LANÇAS, F. M. Uma abordagem conceitual das técnicas miniaturizadas de preparo de amostra e suas aplicações na análise de resíduos e contaminantes em matrizes alimentares. **Scientia Chromatographica**, v. 7, n. 3, p. 157–182, 2015.

MACHADO, A. B. **Estudos do processo de extração líquido-líquido para a purificação do ácido acrílico**. 2007. Dissertação (Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas. São Paulo. 2007.

MARSON, M. E.; PADRÓ, J. M.; RETA, M. R.; ALTCHÉH, J.; GARCÍA-BOURNISSEN, F.; MASTRANTONIO, G. I. A simple and efficient HPLC method for benznidazole dosage in human breast milk. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 35, n. 4, p. 522–526, 2013.

MARSON, M. E.; GARCÍA-BOURNISSEN, F.; ALTCHÉH, J.; MOSCATELLI, G.; MORONI, S.; MASTRANTONIO, G. E. Presence of benznidazole conjugated metabolites in urine identified by β -glucuronidase treatment. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 56, p. 4–11, 2020.

MARSÓN, M. E.; DANA, D. D.; ALTCHÉH, J.; GARCÍA-BOURNISSEN, F.; MASTRANTONIO, G. Development of UV/HPLC methods for quantitative analysis of benznidazole in human plasma and urine for application in pediatric clinical studies. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 27, n. 5, p. 384–390, 2013.

MARTÍNEZ, N.; MARSON, M. E.; MASTRANTONIO, G. E.; RABA, J.; CERUTTI, S. Development of a LC-MS/MS methodology for the monitoring of the antichagasic drug benznidazole in human urine. **Talanta**, v. 131, p. 656–660, 2015.

MAXIMIANO, F. P.; COSTA, G. H. Y.; SOUZA, J.; CUNHA-FILHO, M. S. S. Caracterização físico-química do fármaco antichagásico benznidazol. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 8, p. 1714-1719, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doença de Chagas Aguda e distribuição espacial dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016. **Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico**, v. 50, p. 10, 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico: Doença de Chagas. **Boletim Epidemiológico: Doença de Chagas**, p. 1–38, 2021.

MOEIN, M. M.; ABDEL-REHIM, A.; ABDEL-REHIM, M. Trends in Analytical Chemistry Microextraction by packed sorbent (MEPS). **Trends in Analytical Chemistry**, v. 67, p. 34–44, 2015.

MOREIRA, B. J.; YOKOYA, J. M. C; GAITANI, C. M. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME): fundamentos, inovações e aplicações biológicas. **Scientia Chromatographica**, v. 6, n. 3, p. 186-204, 2014.

MORENO, M.; D'ÁVILA, D. A.; SILVA, M. N.; GALVÃO, L. M. C.; MACEDO, A. M.; CHIARI, E.; GONTIJO, E. D.; ZINGALES, B. Trypanosoma cruzi benzimidazole susceptibility in vitro does not predict the therapeutic outcome of human Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 7, p. 918-924, Nov. 2010.

MORILLA, M. J.; BENAVIDEZ, P.E.; LOPEZ, M. O.; ROMERO, E. L. Liposomal benzimidazole: A high-performance liquid chromatographic determination for biodistribution studies. **Journal of Chromatographic Science**, v. 41, n. 8, p. 405–409, 2003.

National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 31593, Benzimidazole.

NOVÁKOVÁ, L.; VLČKOVÁ, H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. **Analytica Chimica Acta**, v. 656, n. 1–2, p. 8–35, 2009.

PADRÓ, J. M.; MARSON, M. E.; MASTRANTONIO, G. E.; ALTCHEH, J.; GARCÍA-BOURNISSEN, F.; RETA, M. Development of an ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction method for the determination of nifurtimox and benzimidazole in human plasma. **Talanta**, v. 107, p. 95–102, 2013.

PAVLOVIĆ, D. M.; BABIĆ, S.; HORVAT, A. J. M.; KAS̃TELAN-MACAN, M. Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 11, p. 1062–1075, 2007.

PENA-PEREIRA, F.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Miniaturized preconcentration methods based on liquid-liquid extraction and their application in inorganic ultratrace analysis and speciation: A review. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 64, n. 1, p. 1–15, 2009.

PEREIRA, J. A. M.; GONÇALVES, J.; PORTO-FIGUEIRA, P.; FIGUEIRA, J. A.; ALVES, V.; PERESTRELO, R.; MEDINA, S.; CAMÂRA, J. S. Current trends on microextraction by packed sorbent-fundamentals, application fields, innovative improvements and future applications. **Analyst**, v. 144, n. 17, p. 5048–5074, 2019.

PERIN, L.; SILVA, R. M.; FONSECA, K. S.; CARDOSO, J. M. O.; MATHIAS, F. A. S.; REIS, L. E. S.; MOLINA, I.; CORREA-OLIVEIRA, R.; VIEIRA, P. M. A.; CARNEIRO, C. M. Pharmacokinetics and tissue distribution of benzimidazole after

oral administration in mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 4, p. 1–9, 2017.

PINAZO, M. J.; GUERRERO, L.; POSADA, E.; RODRÍGUEZ, E.; SOY, D. GASCON, J. Benzimidazole-related adverse drug reactions and their relationship to serum drug concentrations in patients with chronic Chagas disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 390–395, 2013.

PŁOTKA-WASYLKA, J.; SZCZEPAN´SKA, N.; GUARDIA, M. de la; NAMIÉS´NIK, J. Modern trends in solid phase extraction: New sorbent media. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 77, p. 23–43, 2016.

POLSON, C.; SARKAR, P.; INCLEDON, B.; RAGUVARAN, V.; GRANT, R. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 785, n. 2, p. 263–275, 2003.

RAAFLAUB, J.; ZIEGLER, W. H. Single-dose pharmacokinetics of the trypanosomicide benzimidazole in man. **Arzneimittelforschung**. 29(10):1611-4. 1979.

ROSEMBERG, J. **Nicotina: droga universal**. São Paulo: SES/CVE, 2003. 174 p.

SAID, R.; POHANKAB, A.; ABDEL-REHIM, M.; BECK, O. Determination of four immunosuppressive drugs in whole blood using MEPS and LC-MS/MS allowing automated sample work-up and analysis. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 897, p. 42–49, 2012.

SAITO, Y.; KAWAZOE, M.; IMAIZUMI, M.; MORISHIMA, Y.; NAKAO, Y.; HATANO, K.; HAYASHIDA, M.; JINNO, K. Miniaturized Sample Preparation and Separation Methods for Environmental and Drug Analyses. **Analytical Sciences**, v. 18, n. 1, p. 7–17, 2002.

SALAMI, Fernanda H; QUEIROZ, Maria Eugênia C. Microextraction in packed sorbent for determination of sulfonamides in egg samples by liquid chromatography and spectrophotometric detection. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo , v. 22, n. 9, p. 1656-1661, Sept. 2011 .

SCHUUR, B.; VERKUIJL, B. J. V.; MINNAARD, A. J.; VRIES, J. G.; HEERES, H. J.; FERINGA, B. L. Chiral separation by enantioselective liquid-liquid extraction. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 36–51, 2011.

SILVA, A. L. M. DA; SOBRINHO, J. L. S.; NETO, P. J. R.; SILVA, R. M. F.; MEDEIROS, F. P. M.; LIMAS, L. G. Desenvolvimento de método analítico por CLAE em comprimidos de Benzimidazol para a Doença de Chagas. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1163–1166, 2007.

SILVESTRE, C. I. C.; SANTOS, J. L. M.; LIMA, J. L. F. C.; ZAGATTO, E. A. G. Liquid-liquid extraction in flow analysis: A critical review. **Analytica Chimica Acta**, v. 652, n. 1–2, p. 54–65, 2009.

SIQUEIRA, S. A.; FERNANDES, C.; CÉSAR, I. C. Microextraction by packed sorbent and high performance liquid chromatography for simultaneous determination of lumefantrine and desbutyl-lumefantrine in plasma samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 190, 2020.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. 2. ed. New York: John Wiley Interscience, 1997. 765 p.

SOUVERAIN, S.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. L. Protein precipitation for the analysis of a drug cocktail in plasma by LC-ESI-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, n. 4, p. 913–920, 2004.

SOUZA, S. V. C. DE. **Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: Delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos**. 2007. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2007.

TANG, Y. Q.; WENG, N. Salting-out assisted liquid-liquid extraction for bioanalysis. **Bioanalysis**, v. 5, n. 12, p. 1583–1598, 2013.

TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: Preparo e aplicações de MIP em técnicas de extração e separação. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1076–1086, 2005.

THURMAN, E. M.; SNAVELY, K. Advances in solid-phase extraction disks for environmental chemistry. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 18–26, 2000.

TIMASHEFF, S. N.; ARAKAWA, T. Mechanism of protein precipitation and stabilization by co-solvents. **Journal of Crystal Growth**, v. 90, n. 1–3, p. 39–46, 1988.

VAGHELA, A.; PATEL, A.; PATEL, A.; VYAS, A.; PATEL, N. Sample Preparation In Bioanalysis: A Review. **International Journal of Scientific & Technology Research**, v. 5, n. 05, p. 6–10, 2016.

VASCONCELOS, I.; SILVA, P. H. R.; DIAS, D. R. D.; MARQUES, M. B. F.; MUSSEL, W. N.; PEDROSA, T. A.; SILVA, M. E. S. R.; FREITAS, R. F. S.; SOUSA, R. G.; FERNANDES, C. Synthesis and characterization of a molecularly imprinted polymer (MIP) for solid-phase extraction of the antidiabetic gliclazide from human plasma. **Materials Science and Engineering C**, v. 116, p. 111191, 2020.

VERAS, F. P. *et al.* **Bioquímica Prática: protocolos para análise de biomoléculas e exercícios complementares.** 1ª ed. Maranhão: Universidade Federal do Maranhão, 2013.

VIANA, I. M. DE O.; LIMA, P. P. R.; SOARES, C. D. V.; FERNANDES, C. Simultaneous determination of oral antidiabetic drugs in human plasma using microextraction by packed sorbent and high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 96, p. 241–248, 2014.

VIEIRA, J. F. P. DO N. **Doença de chagas no Piauí: distribuição geográfica dos óbitos de 2003 a 2013 e identificação de vetores em comunidades rurais de São João do Piauí.** [s.l.] Instituto Oswaldo Cruz, 2017.

WIERUCKA, M.; BIZIUK, M. Application of magnetic nanoparticles for magnetic solid-phase extraction in preparing biological, environmental and food samples. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 59, p. 50–58, 2014.

WORKMAN, P.; WHITE, R. A. S.; WALTON, M. I.; OWEN, L. N.; TWENTYMAN, P.R. Preclinical Pharmacokinetics of benznidazole. **British Journal of Cancer**, v. 50, p. 291–303, 1984.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease (also known as American trypanosomiasis).** [S. l.], 1 abr. 2021. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Acesso em: 5 maio 2021.

YANG, L.; SAID, R.; ABDEL-REHIM, M. Sorbent, device, matrix and application in microextraction by packed sorbent (MEPS): A review. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1043, p. 33–43, 2017.

ANEXO I

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Determinação de benznidazol em plasma humano utilizando nanomateriais como sorvente para extração em fase sólida

Pesquisador: CHRISTIAN FERNANDES

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 26669419.3.0000.5149

Instituição Proponente: PRO REITORIA DE PESQUISA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.964.479

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto da área de Ciências da Saúde que propõe desenvolver e validar método bioanalítico para a extração de benznidazol a partir de amostras de plasma humano, utilizando nanomateriais, tais como nanopartículas de sílica mesoporosa e nanotubos de nitreto de boro, como sorventes extratores e análise por cromatografia a líquido de alta eficiência.

Conforme o proponente, A doença de Chagas, ainda hoje, afeta de 6 a 7 milhões de pessoas na América Latina e causa cerca de 10 mil mortes por ano, segundo dados da Organização Mundial da Saúde. A doença é causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi*, que é transmitido aos seres humanos através da picada do barbeiro. Entre os principais sintomas relatados estão: lesão cutânea, inchaço das pálpebras e das glândulas linfáticas, febre, dor de cabeça, dores musculares, dificuldade de respirar e dores abdominais. Na fase crônica da doença pode ocorrer arritmia cardíaca, insuficiência cardíaca, infarto ou mesmo o óbito. O benznidazol é o principal medicamento empregado para o tratamento da doença de Chagas. A determinação da concentração plasmática de benznidazol em humanos é importante em estudos clínicos, farmacocinéticos, no desenvolvimento de novas formulações e na monitorização terapêutica. Nesse contexto, o desenvolvimento de métodos analíticos adequados é fundamental. Geralmente, os métodos bioanalíticos compreendem quatro etapas distintas: preparo de amostras, separação, detecção e tratamento dos dados obtidos. Destas etapas, aquela que ainda necessita de maior

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad Sl 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 3.964.479

desenvolvimento é o preparo de amostras, já que a maioria dos procedimentos utilizados atualmente são demorados, laboriosos e empregam elevada quantidade de reagentes tóxicos. Nos últimos anos, novos materiais têm sido desenvolvidos e utilizados como sorvente para extração. Dentre esses, as nanopartículas mesoporosas de sílica e os nanotubos de nitreto de boro têm potencial para serem utilizados para esse fim. Assim, com este trabalho objetiva-se desenvolver método bioanalítico, empregando-se extração em fase sólida no preparo de amostra, utilizando nanomateriais como sorvente, e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV-visível.

Na Metodologia Proposta: - As amostras de plasma serão obtidas de voluntários sadios que se dispuserem a contribuir com o projeto e serão coletadas no Laboratório de Hematologia da Faculdade de Farmácia da UFMG, após aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética.

-- Os métodos validados serão aplicados na determinação quantitativa de benznidazol em amostras de plasma de voluntários.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Desenvolver método bioanalítico para extração de benznidazol em plasma humano utilizando nanopartículas mesoporosas de sílica e nanotubos de nitreto de boro como sorvente de extração e cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção UV-visível. Objetivo Secundário: - Avaliar a seletividade das nanopartículas mesoporosas de sílica e dos nanotubos de nitreto de boro para extração de benznidazol. - Otimizar as condições da etapa de preparo de amostra, como quantidade de material sorvente, volume da amostra, solventes eluentes e extratores. - Desenvolver método bioanalítico para determinação de benznidazol em plasma humano. - Aplicar o método desenvolvido em amostras de plasma de voluntários contendo benznidazol.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os riscos relacionados ao procedimento de coleta das amostras de sangue são: leve dor localizada associada à picada da agulha ou hematoma; e, raramente, sensação momentânea de tontura. Os riscos relacionados ao uso de benznidazol incluem: náuseas, vômitos, febre, cefaleia, prurido e, em casos mais graves, astenia, parestesia, rash cutâneo, dermatites causadas por hipersensibilidade e edema nas extremidades. Benefícios: A identificação e a quantificação de fármacos em plasma humano são importantes nos estudos de farmacocinética, em estudos de bioequivalência e biodisponibilidade e na monitorização terapêutica de usuários de benznidazol e

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 3.964.479

no acompanhamento da adesão dos pacientes ao tratamento. A técnica extração em fase sólida pode extrair, seletivamente, o analito de interesse, eliminando a presença de interferentes e aumentando a confiabilidade dos resultados. Além disso, a técnica permite uma pré-concentração do analito e a redução do gasto de uso de solventes orgânicos. Os resultados obtidos neste projeto serão divulgados em eventos científicos e publicados em periódicos internacionais. Outra contribuição deste estudo é a ampliação de conhecimentos na área de preparo de amostras e desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa com proposta de desenvolvimento de método analítico para detecção de medicamento usado na terapêutica de Doença de Chagas, com procedimento experimental que envolve a utilização de material biológico humano (plasma), de voluntários com idade superior a 18 anos. Previsão de início em dezembro de 2019.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados Folha de Rosto assinada pela Diretora da Faculdade de Farmácia da UFMG, Parecer consubstanciado aprovado pelo Departamento Produtos Farmacêuticos, Projeto Detalhado, TCLEs para grupo 1 e 2, correspondentes a doadores de plasma sem o medicamento e doadores de plasma que receberam uma dose do medicamento benznidazol, respectivamente.

Inserida nessa versão a Carta resposta, Termo de Constituição de Biorrespositório e TCLEs com correções.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O pesquisador atendeu as pendências do protocolo, parecer nº 3.903.469, PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_3903469.pdf.

SMJ, o projeto "Determinação de benznidazol em plasma humano utilizando nanomateriais como sorvente para extração em fase sólida" do pesquisador Christian Fernandes, está aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o CEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS**



Continuação do Parecer: 3.964.479

pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1336536.pdf	01/04/2020 14:41:30		Aceito
Outros	Parecer_consultado_departamento.pdf	01/04/2020 14:37:32	CHRISTIAN FERNANDES	Aceito
Outros	Carta_resposta.pdf	01/04/2020 14:36:31	CHRISTIAN FERNANDES	Aceito
Outros	Termo_de_constituicao_de_biorrepositorio.pdf	01/04/2020 14:34:45	CHRISTIAN FERNANDES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_pesquisa.pdf	01/04/2020 14:31:25	CHRISTIAN FERNANDES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_grupo_2.pdf	01/04/2020 14:30:52	CHRISTIAN FERNANDES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_grupo_1.pdf	01/04/2020 14:30:41	CHRISTIAN FERNANDES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_compromisso.pdf	26/11/2019 11:37:26	CHRISTIAN FERNANDES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_de_concordancia.pdf	26/11/2019 11:36:51	CHRISTIAN FERNANDES	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	26/11/2019 11:27:44	CHRISTIAN FERNANDES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 3.964.479

BELO HORIZONTE, 10 de Abril de 2020

Assinado por:
Críssia Carem Paiva Fontainha
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br